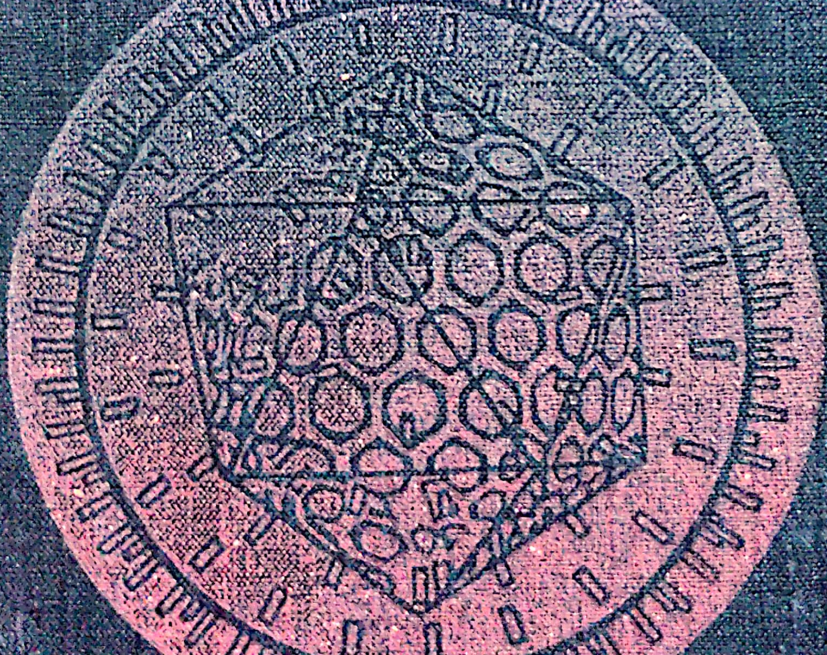
1

TRATAT DE VIRUSOLOGIE MEDICALĂ

SUB REDACȚIA

N. CAJAL



EDITURA MEDICALĂ

Sub redacția:
N. CAJAL

TRATAT DE VIRUSOLOGIE MEDICALĂ

VOL. I

EDITURA MEDICALĂ
BUCUREȘTI 1990

ISBN 973-39-0072-9
ISBN 973-39-0073-7

Lista colaboratorilor

Antohi Ștefan, doctor în științe medicale, medic primar microbiologie, cercetător principal.

Burducea Ovidiu, doctor în științe biologice, cercetător științific principal, Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau", București.

Cajal Nicolae, doctor docent în științe medicale, membru al Academiei, Române, profesor de virusologie I.M.F. București, directorul Institutului de Virusologie „Ștefan S. Nicolau", București.

Cernescu Costin, doctor în științe medicale, cercetător științific principal, Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau", București.

Copelovici Yolanda, doctor în științe medicale, cercetător științific principal, Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau", București.

Cristea Alexandru, cercetător științific principal, Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau", București.

Danielescu Georgeta, doctor în științe medicale, medic primar microbiologie-virusologie, cercetător principal, Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau", București.

Dumitrescu Stelian, doctor în științe medicale, cercetător științific principal, Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau", București.

Eșanu Vladimir, doctor în științe biologice, cercetător științific principal, Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau", București.

Maniu Horia, cercetător științific, Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau", București.

Popa Liviu, doctor în științe chimice, conferențiar Institutul Politehnic, cercetător științific principal, Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau", București.

Repanovici Rodica, doctor în științe chimice, cercetător științific principal, Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau", București.

Strati Ion, doctor în științe medicale, medic primar microbiologie-virusologie.

Tomas Ernest, doctor în științe chimice, cercetător științific principal, Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau", București.

Cuprins

Listă de abrevieri — 13
1. **Introducere** — N. Cajal — 17
Bibliografie selectivă — 24
2. **Clasificarea virusurilor** — N. Cajal și C. Cernescu — 27
2.1. Istoric — 27
2.2. Criterii taxonomice — 27
2.3. Stadiul actual al clasificării virusurilor vertebratelor — 29
2.4. Dezoxiribovirusuri — 31
2.4.1. Familia Parvoviridae — 31
2.4.2. Familia Hepadnaviridae — 32
2.4.3. Familia Papovaviridae — 32
2.4.4. Familia Adenoviridae — 33
2.4.5. Familia Herpesviridae — 34
2.4.6. Familia Poxviridae — 35
2.5. Ribovirusuri — 36
2.5.1. Familia Picornaviridae — 36
2.5.2. Familia Caliciviridae — 37
2.5.3. Familia Togaviridae — 37
2.5.4. Familia Flaviviridae — 38
2.5.5. Familia Bunyaviridae — 39
2.5.6. Familia Rhabdoviridae — 39
2.5.7. Familia Reoviridae — 39
2.5.8. Familia Coronaviridae — 40
2.5.9. Familia Arenaviridae — 40
2.5.10. Familia Orthomyxoviridae — 41
2.5.11. Familia Paramyxoviridae — 42
2.5.12. Familia Retroviridae — 43
2.6. Tendințe recente în clasificarea virusurilor — 45
Bibliografie selectivă — 46
3. **Morfologia, structura și compoziția chimică a virusurilor** — S. Dumitrescu și E. Tomas — 48
3.1. Morfologia virionilor — 48
3.1.1. Genomul viral — 49
3.1.2. Capsida virală — 52
3.1.3. Învelișul extern — 52
3.2. Virusuri cu simetrie helicoidală — 56
3.2.1. Orthomyxovirusurile — 57
3.2.2. Paramyxovirusurile — 59
3.2.3. Rhabdovirusurile — 59
3.2.4. Coronavirusurile — 61
3.3. Virusuri cu simetrie icosaedrică — 62
3.3.1. Picornavirusurile — 63
3.3.2. Reovirusurile — 64
3.3.3. Adenovirusurile — 64
3.3.4. Virusurile herpetice — 66
3.4. Virusuri cu organizare complexă — 68
3.4.1. Poxvirusurile — 68
3.4.2. Retrovirusurile — 69
Bibliografie selectivă — 69
4. **Acțiunea agenților fizici, chimici și biologici asupra virusurilor și replicării virale** — O. Burducea — 70
4.1. Introducere — 70
4.2. Acțiunea agenților fizici, chimici și biologici asupra virusurilor — 71
4.2.1. Agenții fizici — 71
4.2.1.1. Temperatura — 71

4.2.1.2. Umiditatea — 74
4.2.1.3. Desicatia — 74
4.2.1.4. Liofilizarea — 75
4.2.1.5. Ultrasunetele (vibrațiile sonice) — 77
4.2.1.6. Presiunile înalte (ultrapresiunea) — 78
4.2.1.7. Presiunea osmotică — 78
4.2.1.8. Forța gravitațională — 79
4.2.1.9. Cîmpul electric — 81
4.2.1.10. Adsorbtia — 83
4.2.1.11. Radiațiile — 98
4.2.2. Agenții chimici — 113
4.2.2.1. Alcoolii — 113
4.2.2.2. Fenolii — 115
4.2.2.3. Aldehidele — 116
4.2.2.4. Solvenții organici ai lipidelor — 116
4.2.2.5. Detergenții sintetici și săpunurile naturale — 117
4.2.2.6. Acizii și sărurile — 118
4.2.2.7. Bazele — 118
4.2.2.8. Agenții oxidanți — 119
4.2.2.9. Halogenii și compușii halogenați — 119
4.2.2.10. Substanțele colorante (agenții fotodinamici) — 120
4.2.2.11. Vitaminele — 121
4.2.2.12. Lactonele — 121
4.2.2.13. Imidele — 122
4.2.2.14. Ionii metalici. Concentrația ionică — 122
4.2.2.15. pH-ul — 123
4.2.3. Agenții biologici — 124
4.2.3.1. Simbioza virusurilor — 124
4.2.3.2. Oul embrionat — 124
4.2.3.3. Culturile de celule — 125
4.2.3.4. Organismul animal — 125
4.2.3.5. Secrețiile organismelor uman și animal — 126
4.2.3.6. Enzimele proteolitice — 128
4.2.3.7. Propolisul (ceara neagră) — 128
4.2.3.8. Extractele de plante — 128
4.2.3.9. Putrefacția și autoliza cadaverică — 128
4.3. Inhibitorii selectivi ai replicării virale — 129
4.3.1. Preventivi ai adsorbției și penetrării virale — 130
4.3.1.1. Compuși chimici cu greutate moleculară mică — 130
4.3.1.2. Substanțe cu greutate moleculară mare, de origine biologică — 131
4.3.2. Inhibitorii replicării intracelulare a virusurilor — 132
4.3.2.1. Compuși chimici cu greutate moleculară mică — 132
4.3.2.2. Analogi structurali ai metaboliților naturali (antimetaboliți, inhibitori metabolici) — 133
4.3.2.3. Nucleotidele — 135
4.3.2.4. Nucleozidele azapirimidinei — 135
4.3.2.5. Aranucleozidele și aranucleotidele — 135
4.3.2.6. Acizii fosfonici — 136
4.3.2.7. Alți compuși chimici — 137
4.3.2.8. Constituenți sau produși microbieni, fungici și virali — 137
4.4. Aspecte critice — 139
4.5. Perspective — 143
Bibliografie selectivă — 146

5. Principalele metode biochimice pentru identificarea și caracterizarea virusurilor — L. Popa — 148
5.1. Introducere — 148
5.2. Metode de caracterizări a genomurilor ARN — 150
5.2.1. Analiza electroforetică în gel de poliacrilamidă — 150
5.2.2. Harta oligonucleotidelor sau cartografia genomului prin metoda amprentelor (maparea oligonucleotidelor) — 153
5.2.3. Hibridizarea ARN — ARN — 156

5.2.4. Determinarea secvențelor de nucleotide — 158
5.3. Metode de caracterizare a genomurilor ADN — 160
5.3.1. Analiza electroforetică în gel de agaroză — 160
5.3.2. Analiza de restricție — 162
5.3.3. Hibridizarea moleculară ADN — ADN — 163
5.3.4. Analiza secvențelor de nucleotide din genom — 166
5.4. Metode de caracterizare a virusurilor, bazate pe analiza proteinelor virale — 170
5.4.1. Analiza electroforetică în gel de poliacrilamidă a proteinelor virale — 170
5.4.2. Analiza antigenică — 174
5.4.3. Focusarea izoelectrică — 175
5.4.4. Harta polipeptidelor — 175
5.4.5. Analiza secvențelor de aminoacizi — 177
Bibliografie selectivă — 177

6. **Replicarea virusurilor** — Rodica Repanovici — 178
6.1. Principalele faze și etape ale replicării virale — 178
6.1.1. Adsorbția virusurilor — 180
6.1.2. Pătrunderea virusurilor — 180
6.1.3. Decapsidarea virusurilor — 181
6.1.4. Transcrierea și traducerea — 182
6.1.5. Replicarea ADN viral — 183
6.1.6. Morfogeneza și eliberarea virusurilor — 184
6.1.7. Clase de sisteme genetice virale — 184
6.2. Replicarea virusurilor cu genom ADN — 186
6.2.1. Replicarea parvovirusurilor — 186
6.2.2. Replicarea hepadnavirusurilor — 192
6.2.3. Replicarea adenovirusurilor — 195
6.2.4. Replicarea herpesvirusurilor — 204
6.2.5. Replicarea poxvirusurilor — 211
6.3. Replicarea virusurilor cu genom ARN — 218
6.3.1. Replicarea picornavirusurilor — 222
6.3.2. Replicarea togavirusurilor — 227
6.3.3. Replicarea coronavirusurilor — 233
6.3.4. Replicarea rhabdovirusurilor — 234
6.3.5. Replicarea paramyxovirusurilor — 239
6.3.6. Replicarea orthomyxovirusurilor — 242
6.3.7. Replicarea arenavirusurilor — 249
6.3.8. Replicarea bunyavirusurilor — 251
6.3.9. Replicarea flavivirusurilor — 253
6.3.10. Replicarea reovirusurilor — 254
6.3.11. Replicarea retrovirusurilor — 259
Bibliografie selectivă — 260

7. **Relații virus — gazdă** — C. Cernescu și N. Cajal — 261
7.1. Spectrul de gazdă și tropismul celular — 261
7.1.1. Receptorii virali — 261
7.1.2. Genele virale implicate în tropismul tisular — 264
7.2. Rezistența genetică a gazdei la invazia virală — 265
7.2.1. Gene ale gazdei care influențează susceptibilitatea virală — 265
7.2.2. Rezistența mediată de genele răspunsului imun — 266
7.2.3. Rezistența mediată simultan de gene virale și ale gazdei — 267
7.3. Cultivarea virusurilor — 268
7.3.1. Sisteme virus — gazdă — 268
7.3.2. Formarea incluziilor virale — 270
7.3.3. Tipuri de efect citopatic — 272
7.3.4. Leziuni cromozomiale determinate de virusuri — 273
7.4. Aspecte morfologice, biochimice și biofizice ale invaziei virale la nivel celular — 276
7.5. Evoluția genomului viral în raport cu gazda — 283
7.5.1. Modificări în genomul virusurilor ADN — 283
7.5.2. Modificări în genomul virusurilor ARN — 284
7.5.3. Modificări în genomul segmentat al unor virusuri — 285

7.5.4. Variante virale cu semnificație clinică — 286
7.6. Patogenia unor viroze umane majore — 287
7.6.1. Infecția gripală — 287
7.6.2. Gastroenteritele virale (GV) — 289
7.6.3. Hepatita B — 290
7.6.4. Febre hemoragice — 292
7.7. Concepte actuale privind implicațiile etiologiei virale în unele boli umane cronice — 294
7.7.1. Diabetul viral-indus — 294
7.7.2. Boli demielinizante viral-induse — 296
7.7.3. Imunosupresia de etiologie virală — 297
Bibliografie selectivă — 298

8. **Genetica virusurilor umane** — N. Cajal, Șt. Antohi și H. Maniu — 300
8.1. Introducere — 300
8.2. Genomul, genotipul și fenotipul virusurilor. Structuralizarea genomului în virionul matur. Stări structurale dobîndite în ciclul infecțios — 303
8.2.1. Genomul viral și genotipul viral — 303
8.2.2. Fenotipul viral — 308
8.3. Acidul nucleic infecțios. Transfecția — 311
8.4. Mutația spontană, mutageneza indusă și markeri genetici virali utilizați pentru analize genetice și scopuri aplicative — 313
8.4.1. Mutația spontană — 313
8.4.2. Mutageneza indusă și agenții mutageni utilizați — 316
8.4.3. Caractere-marker ale evenimentelor mutaționale spontane sau induse. Tipuri de mutanți — 317
8.5. Recombinarea la virusuri umane. Hărți genetice clasice — 321
8.5.1. Recombinarea intramoleculară, complementarea și hărți genetice virale — 322
8.5.2. Recombinare prin reasocieri genomice la virusuri cu genomuri plurimoleculare — 328
8.6. Interacțiuni intervirale și virus — celulă-gazdă de tip genomic și epigenomic — 330
8.6.1. Interacțiuni intervirale — 330
8.6.1.1. Interacțiuni genomice intervirale — 330
8.6.1.2. Interacțiuni epigenomice intervirale — 331
8.6.2. Interacțiuni virus — celulă-gazdă — 332
8.6.2.1. Recombinări cu integrare de fragmente citogenomice în genomul viral — 333
8.6.2.2. Mutații citogenomice induse de infecții virale — 333
8.7. Metodele secvențierii de ADN și ARN, tehnicile de hibridizare cu sonde de acid nucleic și cunoașterea structurilor intime ale genomurilor virale. Hărți genetice moleculare — 334
8.7.1. Secvențierea ADN, secvențierea ARN. Hărți genetice moleculare — 334
8.7.2. Tehnici de hibridizare ARN — ADN. Tehnicile Southern și Northern cu acizi nucleici marcați radioactiv ca sonde — 341
8.8. Aporturile secvențierilor, clonărilor și hibridizărilor moleculare genetice în precizarea mecanismelor expresiei genice virale — 342
8.8.1. Un rezumat al expresiei genice generale și al replicării, ca referință pentru caracteristici observate la virusuri — 343
8.8.2. Segmentele de inițiere a replicării ADN — ori — și proteine inițiatoare legate genomului. Replicare de ARN la ribovirusuri — 345
8.8.3. Tipuri de transcrieri stînga — dreapta. Gene suprapuse. Promotori, terminatori, segmente ORF și activatori — 345
8.8.4. Gene discontinue (introno-exonice) descrise mai întîi la virusuri și corespondența : o genă — mai multe proteine — 349
8.9. Implicațiile cunoștințelor de genetică în epidemiologia și profilaxia bolilor infecțioase virale — 353
8.10. Concluzii și prospectări — 356
Bibliografie selectivă — 357

9. **Persistența virală** — C. Cernescu — 359
9.1. Definiție și clasificare — 359

    - 9.1.1. Infecția virală cronică — 360
    - 9.1.2. Infecția virală latentă — 361
    - 9.1.3. Infecția virală lentă — 361
    - 9.1.4. Infecții virale persistente *in vitro* — 361
  - 9.2. Mecanisme virale implicate în inițierea și menținerea persistenței — 362
    - 9.2.1. Generarea particulelor defectiv-interferente — 363
    - 9.2.2. Implicarea mutantelor virale în infecția persistentă — 365
    - 9.2.3. Variația antigenică — 366
  - 9.3. Rolul gazdei în persistența virală — 368
    - 9.3.1. Răspunsul inflamator — 368
    - 9.3.2. Interferonul și patogenia persistenței virale — 369
    - 9.3.3. Inițierea persistenței prin anticorpi specifici — 371
  - 9.4. Aspecte clinice specifice ale persistenței virale — 374
  - Bibliografie selectivă — 380

- 10. **Imunitatea virală** — Georgeta Danielescu și N. Cajal — 381
  - 10.1. Introducere — 381
  - 10.2. Mecanisme de apărare umorală — 382
    - 10.2.1. Rolul sistemului complement în apărarea gazdei față de infecția virală — 382
    - 10.2.2. Răspunsurile imune umorale față de antigenele virale — 385
  - 10.3. Funcții antivirale ale anticorpului — 387
    - 10.3.1. Neutralizarea virusurilor prin anticorpi — 387
    - 10.3.2. Distribuția anatomică a anticorpului și problema imunității locale — 389
    - 10.3.3. Funcția biologică a sistemului imun secretor — 390
  - 10.4. Recunoașterea imunologică și mecanisme efectoare în maladiile infecțioase — 391
    - 10.4.1. Macrofagele — 395
    - 10.4.2. Celulele ucigașe (celulele K) și citotoxicitatea celulară dependentă de anticorpi (ADCC) — 396
    - 10.4.3. Celulele natural-ucigașe (celulele NK) și citotoxicitatea naturală mediată de celule (NCMC) — 398
  - 10.5. Răspunsul imun celular și rolul biologic al antigenelor majore de transplantare — 399
  - 10.6. Răspunsuri imune celulare față de virusuri — 402
    - 10.6.1. Limfocitele T citotoxice în infecțiile virale experimentale — 403
    - 10.6.2. Antigenele-țintă induse de virusuri — 404
    - 10.6.3. Comparația specificității serologice și a celulelor T citotoxice — 405
    - 10.6.4. Evidența interacțiunii dintre antigenele proprii *(self)* și antigenele virale — 405
    - 10.6.5. Virusurile inductoare a hipersensibilității de tip întîrziat — restricția prin complexul major de histocompatibilitate și fenotipurile de membrană — 408
    - 10.6.6. Citotoxicitatea celulară dependentă de anticorpi (ADCC) și infecțiile virale — 412
    - 10.6.7. Celulele NK în infecția virală — 413
  - 10.7. Aspecte imunologice în tumorile induse de virusuri — 417
  - 10.8. Imunoprofilaxia infecțiilor virale — 423
  - 10.9. Aspecte imunopatologice asociate infecțiilor virale — 430
    - 10.9.1. Răspunsuri față de antigene nevirale — 430
    - 10.9.2. Interacțiunea virusului cu sistemul imun — 431
    - 10.9.3. Gene ale gazdei și gene virale care determină gradul formării complexelor imune și depozitarea lor — 433
  - 10.10. Rolul virusurilor în autoimunitate — 434
  - Bibliografie selectivă — 438

- 11. **Vaccinuri virale** — C. Cernescu — 439
  - 11.1. Generalități — 439
    - 11.1.1. Vaccinuri virale vii — 439
    - 11.1.2. Vaccinuri virale inactivate — 440
  - 11.2. Noi tehnici în producerea vaccinurilor virale — 442
  - 11.3. Standardizarea și securitatea vaccinurilor — 443

11.4. Strategia aprecierii vaccinurilor în teren — 444
11.5. Contraindicațiile vaccinărilor — 445
11.6. Calendarul vaccinărilor — 447
11.7. Certificate internaționale de vaccinare — 448
11.8. Vaccinuri în viroze specifice — 448
  11.8.1. Vaccinurile poliomielitice — 450
  11.8.2. Vaccinurile rujeolice — 452
  11.8.3. Vaccinul urlian — 453
  11.8.4. Vaccinul rubeolic — 454
  11.8.5. Vaccinul gripal — 454
  11.8.6. Vaccinuri adenovirale — 456
  11.8.7. Vaccinuri paramyxovirale — 456
  11.8.8. Vaccinul rabic — 457
  11.8.9. Vaccinul variolic — 458
  11.8.10. Vaccinurile arbovirale — 459
  11.8.11. Vaccinurile hepatitice — 460
  11.8.12. Vaccinuri în gastroenterite virale — 460
  11.8.13. Vaccinurile herpetice — 461
11.9. Oportunitatea vaccinării în afecțiuni maligne, posibil virale — 461
11.10. Probleme nerezolvate — 462
Bibliografie selectivă — 463

12. **Interferență — interferon** — Georgeta Danielescu — 465
12.1. Interferența — 465
12.2. Inteferonul — 467
  12.2.1. Sistemul interferon — 468
  12.2.2. Activitatea antivirală prin transfer indusă de interferon — 469
  12.2.3. Definiții și criterii pentru acceptarea unui inhibitor viral cu interferon — 469
  12.2.4. Inductori de interferon — 470
    12.2.4.1. Virusurile inductoare de interferon — 470
    12.2.4.2. Acizii nucleici inductori de interferon — 471
    12.2.4.3. Inductori de interferon cu greutate moleculară mică — 472
    12.2.4.4. Microorganisme nevirale inductoare de interferon — 472
    12.2.4.5. Antigene și mitogene inductoare de interferon — 473
  12.2.5. Producerea și proprietățile fizico-chimice ale interferonilor de tip uman — 475
    12.2.5.1. Hu IFN alfa Le (interferonul leucocitar) — 475
    12.2.5.2. Hu IFN alfa Ly (interferonul limfoblastoid) — 476
    12.2.5.3. Hu IFN beta (interferonul fibroblastic) — 476
    12.2.5.4. Hu IFN gamma — 477
    12.2.5.5. Clonarea și expresia interferonilor umani la microorganisme (interferonul recombinant obținut prin tehnici de inginerie genetică, Hur IFN) — 477
    12.2.5.6. Interferoni umani hibrizi — 478
  12.2.6. Specificitatea de specie a interferonului — 478
  12.2.7. Efecte biologice ale interferonului — 479
    12.2.7.1. Rolul receptorilor de membrană asupra efectelor biologice ale interferonului — 481
    12.2.7.2. Activitatea antivirală — 482
    12.2.7.3. Activitatea inhibitoare asupra multiplicării celulare — 484
    12.2.7.4. Rolul interferonului în modularea activității celulelor efectoare imune — 485
    12.2.7.5. Activitatea antitumorală a interferonului — 490
  12.2.8. Folosirea interferonului exogen în maladiile maligne umane — 491
  12.2.9. Folosirea clinică a interferonului în infecțiile de etiologie virală — 495
  12.2.10. Concluzii — 498
  Bibliografie selectivă — 498

13. **Chimioterapia antivirală** — V. Eșanu — 500
13.1. Introducere — 500
  13.1.1. Chimioprofilaxia antivirală — 502
  13.1.2. Aspecte farmacocinetice și farmacologice — 503

13.1.3. Probleme ale testării medicamentelor — 506
13.1.4. Asocierea medicamentelor antivirale — 507
13.1.5. Transportul medicamentelor la ţintele lor — 508
13.2. Agenţi antivirali — 511
13.2.1. Analogi nucleozidici — 511
13.2.1.1. Analogi nucleozidici prin modificări în nucleele purinice sau pirimidinice — 512
13.2.1.2. Analogi nucleozidici prin modificări în nucleul glucidic (arabinozilnucleozide şi arabinozilnucleotide (ara-X şi ara-XP$_{1-3}$)—518
13.2.1.3. Nucleozide pirimidinice — 525
13.2.1.4. Analogi nucleozidici şi nucleotidici prin schimbarea bazei şi glucidului — 527
13.2.1.5. Fosfonaţii — 528
13.2.2. Amantadina şi derivaţii săi — 531
13.2.3. Peptide inhibitoare ale replicării virale — 535
13.2.4. Polinucleotide monocatenare — 538
13.2.4.1. Acţiunea analogilor polinucleotidici asupra enzimelor — 539
13.2.4.2. Acţiunea polinucleotidelor ARN monocatenare asupra virusurilor litice — 541
13.2.5. Efectul fotodinamic inactivant — 541
13.2.5.1. Compuşi fotodinamici cu activitate antivirală — 543
13.2.6. Cationi şi agenţi de chelare ai cationilor — 544
13.2.7. Compuşi de origine naturală — 550
13.2.8. Alţi compuşi de sinteză — 552
Bibliografie selectivă — 553

14. Epidemiologia virală — Yolanda Copelovici, Al. Cristea — 555
14.1. Introducere — 555
14.2. Fenomene morbide de masă induse de virusuri — 557
14.2.1. Procesul epidemiologic viral — 557
14.2.2. Procesul infecţios — 560
14.2.3. Modalităţi evolutive specifice virozelor — 562
14.3. Factorii procesului epidemiologic — 564
14.3.1. Factorii determinanţi — 564
14.3.1.1. Sursa de infecţie — 564
14.3.1.2. Calea de transmitere — 565
14.3.1.3. Gazda — 568
14.3.2. Factorii favorizanţi — 569
14.4. Depistarea şi identificarea fenomenelor morbide de masă (supravegherea epidemiologică în viroze) — 570
14.4.1. Lanţul informaţional-decizional implicat în supravegherea epidemiologică — 571
14.4.2. Surse de date epidemiologice — 572
14.5. Prevenirea şi combaterea virozelor — 575
14.5.1. Măsuri de control al surselor de infecţie — 575
14.5.2. Blocarea căilor de transmitere — 576
14.5.3. Protecţia masei receptive — 577
14.6. Modele matematice în epidemiologia virală — 579
14.6.1. Variabile şi riscuri epidemiologice — 579
14.6.2. Modelul matematic simplificat folosit şi regularităţile explicate — 581
14.6.3. Cercetări operaţionale de optimizare a programelor antiepidemice — 591
Bibliografie selectivă — 595

15. Diagnosticul de laborator al infecţiilor virale — N. Cajal, I. Strati şi Yolanda Copelovici — 597
15.1. Generalităţi asupra importanţei identificării infecţiilor virale — 597
15.2. Desfăşurarea activităţii de diagnostic de laborator al infecţiilor virale — 601
15.2.1. Recoltarea probelor necesare efectuării diagnosticului de laborator — 601
15.2.2. Transportul probelor la laborator — 603

- 15.2.3. Procedee pentru identificarea virusului, a antigenelor și a altor componente virale — 604
- 15.3. Metodologii și procedee de diagnostic — 610
  - 15.3.1. Izolarea și identificarea virusurilor — 610
    - 15.3.1.1. Izolarea prin inocularea animalelor de laborator — 610
    - 15.3.1.2. Izolarea prin inocularea ouălor embrionate — 612
    - 15.3.1.3. Izolarea prin inoculare în culturi de celule — 613
    - 15.3.1.4. Identificarea virusurilor izolate — 618
  - 15.3.2. Diagnosticul serologic al infecțiilor virale — 620
  - 15.3.3. Microscopia electronică (ME) și imunomicroscopia electronică (IME) — 623
  - 15.3.4. Examinarea preparatelor (frotiuri și secțiuni) prin colorare pentru microscopia optică — 627
  - 15.3.5. Examinarea microscopică a preparatelor colorate cu anticorpi marcați cu fluorocromi sau cu enzime — 627
    - 15.3.5.1. Imunofluorescența (IF) — 629
    - 15.3.5.2. Procedee imunoperoxidazice (IPO) — 635
  - 15.3.6. Procedee imunoenzimatice, radioimunologice și fluoroimunologice — 639
    - 15.3.6.1. Procedee fluoroimunologice (FIA) — 639
    - 15.3.6.2. Procedee imunoenzimatice (RIE) — 641
    - 15.3.6.3. Procedee radioimunologice (RIA) — 651
  - 15.3.7. Procedee bazate pe precipitarea complexelor antigen — anticorp — 660
    - 15.3.7.1. Dubla difuzie în gel (DD) — 662
    - 15.3.7.2. Imunodifuzia radială — 663
    - 15.3.7.3. Contraimunoelectroforeza (CIEF) — 663
  - 15.3.8. Procedee de aglutinare pe suport — 670
    - 15.3.8.1. Latexaglutinarea (LA) — 671
    - 15.3.8.2. Hemaglutinarea pasivă (HAP) — 673
  - 15.3.9. Reacția de fixare a complementului, reacțiile de hemaglutinare, hemaglutinoinhibare și reacția de neutralizare — 675
    - 15.3.9.1. Reacția de fixare a complementului (RFC) — 676
    - 15.3.9.2. Hemaglutinarea (HA) și hemaglutinoinhibarea (HAI) — 680
    - 15.3.9.3. Reacția de neutralizare (RN) — 684
  - 15.3.10. Identificarea anticorpilor de tip IgM în cursul diagnosticului serologic — 688
  - 15.3.11. Alte procedee de diagnostic imunologic — 694
    - 15.3.11.1. Imunohemoliza radială (IHR) — 694
    - 15.3.11.2. Testul de hemaglutinare prin imunoaderență (IAHA) — 697
    - 15.3.11.3. Determinarea imunologică în strat subțire (TIA) — 698
    - 15.3.11.4. Determinări în fază solidă derivate din RIE — 699
  - 15.3.12. Hibridizarea — 700
- 15.4. Proteina A (PA) și stafilococul Cowan I (SPA) care o conține în diagnosticul infecțiilor virale — 702
- 15.5. Anticorpii monoclonali (AM) — 710
- 15.6. Aprecieri asupra diagnosticului infecțiilor virale — 712
- Bibliografie selectivă — 715

Listă de abrevieri

AAV — *adeno-associated virus* (virus adeno-asociat)
ABTS — acid azinobenzotiazolinsulfonic
Ac — anticorp
ACG — acicloguanidină
ADCC — *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (citotoxicitate celulară dependentă de anticorpi)
AFA — acid fosfonoacetic
AFF — acid fosfonoformic
AFT — acid fosfotungstic
Ag — antigen
AgHB$_c$ — antigenul de miez („core") al HBV
AgHB$_e$ — antigenul e al HBV
AgHB$_s$ — antigen de suprafață al HBV
AgT — antigen tumoral
AM — anticorpi monoclonali
AMV — *avian myeloblastosis virus* (virusul mieloblastozei aviare)
ANț — acid nucleic-țintă
Ara-A — arabinoziladenină
Ara-C — arabinozilcitozină
Ara-G — arabinozilguanină
Ara-Hx — arabinozilhipoxantină
Ara-T — arabinoziltimină
Ara-U — arabinoziluracil
AVB — aglutinare virus-bacteriană
AZT — azidotimidină
Bat IFN — interferon de șobolan
BDU — bromodezoxiuridină
BHAP — blocarea reacției de hemaglutinare pasivă
Boo IFN — interferon bovin
BVDC — bromovinildezoxicitidină
BVDU — bromovinildezoxiuridină
CELIA — *competitive enzyme-linked immunoassay* (tehnică imunoenzimatică de competiție)
CH — carcinom hepatocelular
CI — complex imun
CI$_{50}$ — concentrație inhibitoare 50%
CIC — complex imun circulant
CIEF — contraimunoelectroforeză
CM$_{inh}$ — concentrație minimă inhibitoare
CMT — concentrație maximă tolerantă
CMV — *cytomegalovirus* (virus citomegalic)
COA — coaglutinare
CVDU — clorovinildezoxiuridină
DBP — *DNA-binding protein* (proteina de legare a ADN)
DCF — dezoxicoformicin
DD — dublă difuzie în gel
DHBV — *duck hepatitis B virus* (virusul hepatitei de tip B de *Anas domestica*)
DDS — dodecilsulfat
DHPA — dihidroxipropiladenină
DI — defectiv-interferent (particule defectiv-interferente)
DI$_{50}$ — doză infectantă 50%
DICT$_{50}$ — doză infectantă 50% pentru culturi de celule
DL$_{50}$ — doză letală 50%
DLM — doză-limită mortală
DMS — durată medie de supraviețuire
DMSO — dimetilsulfoxid
EAE — encefalomielită alergică experimentală
EBV — *Ebstein-Barr virus* (virusul Ebstein-Barr)

ECP — efect citopatic
EDTA — acid etilendiaminotetraacetic
EEE — *east equine encephalitis* (encefalită ecvină de est)
EGTA — acid etilenglicoltetraacetic
EHNA — eritrohidroxinoniladenină
EID — electroimunodifuzie
EIOP — electroimunoosmoforeză
ELISA — *enzyme-linked immunosorbent assay* (tehnică cu enzime legate de imunosorbenţi)
EMVC — *encephalomyocarditis virus* (virusul encefalomiocarditic)
EPSS — encefalopatii subacute spongiforme
EMIT — *enzyme multiplied immunoassay technique* (tehnică imunoenzimatică de multiplicare)
FC — fixare de complement
FCR — receptor pentru fragmentul Fc al imunoglobulinei
FDU — fluorodezoxiuridină
FF — factor de fuziune
FIA — fluoroimunoanaliză
FIAC — fluoroiodoaracitozină
FR — factor reumatoid
5-Fu — 5-fluorouracil
GCSA — *Gross cell surface antigen* (antigen de suprafaţă găsit la nivelul membranelor celulare infectate cu virus Gross)
GSHV — *ground squirrel hepatitis virus* (virusul hepatitei de *Spermophilus beeccheyi*)
GV — gastroenterite virale
HA — hemaglutinare
HAd — hemadsorbţie
HAdI — inhibarea hemadsorbţiei
HAI — hemaglutinoinhibare
HAP — hemaglutinare pasivă
HAPI — hemaglutinare pasivă inversă
HAV — *hepatitis A virus* (virusul hepatitei de tip A)
HBB — hidroxibenzilbenzimidazol
HBV — *hepatitis B virus* (virusul hepatitei de tip B)
HDC — *human diploid cells* (celule diploide umane)
HIV — *human immunodeficiency virus* (virusul sindromului de imunodeficienţă umană)
HSV — *herpes simplex virus* (virusul herpes simplex)
HTLV — *human T cell leukemia viruses* (virusurile leucemiilor umane cu celule T)
Hu IFN — interferon uman
IAHA — *immune adherence hemagglutination test* (hemaglutinare prin imunoadsorbţie)
ID — imunodifuzie
IDU — iododezoxiuridină
IDRS — imunodifuzie radială simplă
IF — imunofluorescenţă
IFI — imunofluorescenţă indirectă
IFN — interferon
IFNr — interferon recombinant
IHR — imunohemoliză radială
IHP — imunohemoliză pasivă
IL-2 — interleukină 2
IME — imunomicroscopie electronică
IPO — reacţie imunoperoxidazică
ITCF — izotiocianat de fluoresceină
IVDU — iodovinildezoxiuridină
LA — latexaglutinare
LAF — *lymphocyte-activating factor* (factorul de activare a limfocitelor)
LMP — leucoencefalopatie multifocală
MCA — membrană corioalantoidiană
ME — microscopie electronică
2-ME — 2-mercaptoetanol
7mG — 7-metilguanozin-5′-trifosfat

MHC — *major histocompatibility complex* (complexul major de histocompatibilitate)
MIF — *migration-inhibitory factor* (factor de inhibiție a migrării celulare)
MLV — *murine leukosis virus* (virusul leucemiei murine)
Mu IFN — interferon murin
NANA — acid N-acetil neuraminic
NCMC — *natural cell-mediated cytotoxicity* (citotoxicitate naturală mediată de celule)
NDV — *Newcastle disease virus* (virusul bolii Newcastle)
NIVGRIP — vaccin gripal endonazal produs de Institutul de Virusologie
ORF — *open reading frame* (regiune deschisă, de codificare)
PA — proteină A
PAGE — electroforeză în gel de poliacrilamidă
PAP — peroxidază-antiperoxidază (complex PAP, reacție PAP)
PDGF — *platelet-derived growth factor* (factor de creștere plachetar)
PEG — polietilenglicol
PESS — panencefalită sclerozantă subacută
PO — peroxidază
PRV — *pseudorabies virus* (virus pseudorabic)
RDE — *receptor-destroying enzyme* (enzimă distrugătoare de receptori)
RFC — reacție de fixare a complementului
RIA — *radioimmunoassay* (radioimunoanaliză)
RIE — reacție imunoenzimatică
RN — reacție de neutralizare
RSV — *respiratory syncytial virus* (virus respirator sincițial)
RT — reverstranscriptază
SBS — sistem biologic sensibil
SIDA — sindromul de imunodeficiență dobîndită
SIgA — imunoglobulină A de tip secretor
SPA — stafilococ Cowan I, conținînd proteina A
SPIEM — *solid phase immuno-electron microscopy* (imunoelectronomicroscopie cu fază solidă)
SSBP — *single strand-binding protein* (proteină de legare la ADN recombinant)
SV40 — *simian virus 40* (virus simian 40)
TAA — *tumor-associated antigen* (antigen asociat tumorii)
TCGF — factor de creștere al celulelor T
TFS — tampon fosfat salin
TIA — *thin layer immunoassay* (determinare imunologică în strat subțire)
TK — timidinkinază
TMV — *tobacco mosaic virus* (virusul mozaicului tutunului)
TR-FIA — *time rezolved FIA* (rezoluția imunofluorescenței în timp)
TSC — tiosemicarbazonă
VEE — *venesuelean equine encephalitis* (encefalită ecvină de Venezuela)
VSV — *vesicular stomatitis virus* (virusul stomatitei veziculoase)
VZV — *varicella-zoster virus* (virusul varicela-zoster)
WEE — *west equine encephalitis* (encefalită ecvină de vest)
WHV — *woodchuck hepatitis virus* (virusul hepatitei Marmotei *Monax*)

1

Introducere

Virusologia, una din cele mai importante ramuri interdisciplinare ale biologiei în general și ale medicinii în special, cu implicații importante în agrotehnică și zootehnie, s-a afirmat ca entitate științifică în cele două decenii cuprinse între 1892 și 1912. Actul său de naștere semnat de botanistul D. I. Ivanovski în 1892 — odată cu descoperirea virusului mozaicului tutunului (TMV) — a fost completat ulterior de o primă biografie la care au contribuit F. Löffler și P. Frosch care au comunicat filtrabilitatea agentului etiologic al febrei aftoase (1897), J. Caroll care a dovedit filtrabilitatea virusului amaril (febra galbenă) și P. Rous care a descoperit (1911) primul virus oncogen (virusul sarcomului Rous la galinacee).

Cu toate acestea, definirea „conceptului de virus“ în acepțiunea sa actuală a fost rodul unor dispute științifice începute la sfîrșitul secolului trecut și continuate apoi de-a lungul următoarelor 7—8 decenii ale secolului al XX-lea (D. I. Ivanovski, M. W. Beijerinck, Em. Roux, Ch. Nicolle A. Borrel, C. Levaditi, S. Nicolau, A. Lwoff ș.a.).

In ciuda marilor progrese făcute de virusologia contemporană, unele aspecte ale definirii virusurilor — și în primul rînd întrebarea în ce măsură virusurile aparțin ori nu lumii vii — rămîn deocamdată fără răspuns, cel puțin pînă la definirea unanim acceptată a fenomenului vital ca atare și a substratului său. Trebuie precizat că școala românească de virusologie consideră virusurile drept cea mai simplă materie înzestrată cu viață.

Poate mai mult decît alte științe, virusologia a apărut în orizontul general al cunoașterii umane ca un paradox. Mai întîi pentru că anumiți oameni de știință au lucrat cu tulpini virale cu mult înainte de a se descoperi primul virus. Unii dintre ei au reușit chiar să prepare vaccinuri eficace, fără a avea cea mai mică noțiune despre virusuri (cazul lui Edward Jenner care a preparat în 1797 „vaccina“, primul vaccin antivariolic) sau avînd noțiuni vagi despre o ipotetică existență a unor germeni „subbacterieni“ (Pasteur — autorul vaccinului antirabic între 1882 și 1885 — care declara că germenii turbării ar fi „*des êtres de raison*“). Tot un paradox a fost considerată multă vreme *natura* virusurilor în sensul că, în ciuda asemănării lor cu bacteriile privind infectivitatea naturală și cea experimentală cît și posibilității de a se prepara vaccinuri și seruri pornind de la antigenele virale, noua clasă de agenți infecțioși se deosebea net de procariote printr-o serie de proprietăți din care unele au fost socotite, la nivelul anilor 1892—1912, a aparține exclusiv materiei fără viață (de exemplu, filtrabilitatea prin bujii Chamberland era socotită ca un apanaj exclusiv al exotoxinelor). La acestea s-au adăugat : imposibilitatea detectării virusurilor cu microscopul optic, faptul că antigenele virale degradate prin acțiunea căldurii excesive sau a unor inactivanți chimici etc. pierdeau proprietatea imunogenă, eșecul seroterapiei dincolo de stadiul de viremie etc.

Reieşea astfel cu claritate, încă la nivelul deceniului 1915—1925, că virusurile sînt entităţi diferite de bacterii iar definirea lor din punct de vedere biologic, patogenic, epidemiologic şi profilacticoterapeutic devenise o necesitate. În acest context se impunea şi o privire retrospectivă a impactului dintre om şi virusuri, o caracterizare istorică a treptelor pe care cunoaşterea umană le-a urcat pînă la nivelul la care sîntem azi, la sfîrşitul celui de-al doilea mileniu.

Din acest punct de vedere noi considerăm că relaţiile dintre virusuri, ca obiect de studiu, şi cunoaşterea ştiinţifică au străbătut următoarele etape : o *perioadă empirică* (pînă către 1880), în care marile epidemii (în special de variolă) au dus atît la cumularea primelor observaţii epidemiologice valabile, dar şi, ca revers al medaliei, la perpetuarea unor explicaţii mistico-animiste improprii. Perioada empirică a impus totuşi unele măsuri de ordin profilactic general (izolarea, carantinarea, supravegherea surselor de apă) şi chiar remedii uimitor de eficace, precum variolizarea, apoi varianta ei perfecţionată — vaccinarea jenneriană.

A urmat o *perioadă de debut* a virusologiei ca entitate ştiinţifică (1892—1953) în care au fost aprofundate aspecte variate ale epidemiologiei şi clinicii bolilor virale, au fost descoperite majoritatea virusurilor responsabile de boli infectocontagioase la om, animale şi plante, au fost stabilite principalele caracteristici ale virusurilor, precizîndu-se deosebirile acestora de procariote, au fost puse la punct metode valabile de diagnostic şi de profilaxie generală şi specifică (vaccinuri virale), a fost iniţiată — deşi cu rezultate încă modeste — chimioterapia virozelor, în fine s-au adus argumente peremptorii privind rolul important al virusurilor în oncogeneză.

O a *treia perioadă,* care ar debuta odată cu definirea rolului jucat de acizii nucleici în multiplicarea virală (1952) este în curs de desfăşurare. Caracteristic acestei etape este faptul că virusologia nu mai poate fi astăzi încadrată în domeniul strict medical, virusurile şi mai ales acizii nucleici virali (ARN sau ADN) fiind în atenţia geneticii moleculare, tehnologiei ADN recombinant, cu repercusiuni în biologia generală, în special în evoluţionism, precum şi în economie, avînd aplicaţii neaşteptate (optimizarea raselor în zootehnie, perfecţionarea muncii de selecţie în agronomie etc.).

Importanţa pentru patologia generală a devenit din ce în ce mai evidentă, precizîndu-se rolul virusurilor în etiopatogenia unui număr din ce în ce mai mare de afecţiuni, chiar şi a unora considerate cîndva drept „neinfecţioase".

Revenind la perioada naşterii virusologiei ca ştiinţă independentă, amintim că sub dominaţia dogmei impuse de L. Pasteur şi R. Koch — potrivit căreia orice boală are drept cauză un anumit microorganism — majoritatea microbiologilor vremii, inclusiv D. Ivanovski, nu puteau concepe că boala mozaicului tutunului ar putea fi cauzată de un agent patogen „neorganismic".

Astfel încît, ca primă reacţie descoperirea lui Ivanovski (prin filtrare) a fost suspectată de eroare tehnică, reproductibilitatea producerii bolii la planta de tutun cu filtratul extractului obţinut din frunzele de tutun infectate conducînd la interpretări și ipoteze noi. Cea mai la îndemînă ipoteză de explicare a noului fenomen — fără să se contrazică dogma strictei specificități — a fost cea după care în extractul filtrat și totuși infectant există un *contagium vivum et fluidum*.

Această formulă avansată cu curaj de Beijerinck, în 1898, dar contrazisă atît de Ivanovski, cît și de Löffler și Frosch (descoperitorii virusului febrei aftoase, în 1897), era apreciată ca fiind de două ori eretică : în primul rînd, pentru că filtrabilitatea era considerată un criteriu de neapartenență la „lumea vie“ ; în al doilea rînd, pentru că agentului patogen i se nega natura organismică. Natura vie a *„contagium*-ului *fluid“*, în ciuda filtrabilității sale demonstrate, constituia un compromis în dogma epocii, dar „solubilitatea“ lui reflecta natura chimică moleculară pe care Beijerinck o acorda invizibilului agent patogen al leziunii frunzelor de tutun, desigur sub influența viziunii fizico-chimice pe care și-o însușise ca urmare a marilor progrese ale epocii în domeniul chimiei și poate chiar prieteniei sale cu Van't Hoff.

La scurt timp, Bauer a încercat să ajungă la un compromis, introducînd formula *contagium fluidum et inanimatum*. Nici această opinie, care a agitat mult lumea microbiologilor, nu a avut șansa să ajungă la un consens. Materialul faptic sărac, tehnicile rudimentare nu puteau încă să ducă la acceptarea ideii după care, deși atît microbii cît și „virusurile“ provoacă „boli infecțioase“ la oameni, animale și plante, mecanismul lor de acțiune asupra organismului-gazdă, ca de altfel întreaga lor structură, mod de multiplicare și destin biologic sînt cu totul diferite. În lanțul de descoperiri, anul 1903 — cînd se cunoșteau cîteva virusuri, entități ce contraziceau bazele patologiei clasice și se supuneau numai parțial postulatelor lui Koch — marchează printr-un articol al lui Émile Roux, publicat în *„Bulletin de l'Institut Pasteur“*, inaugurarea literaturii virusologice.

...„Pasteur, maestul meu — scria Roux — a căutat să izoleze încă din 1881 microbul turbării și nereușind și-a dat seama că are de-a face cu un germen mult mai mic, pe care-l numea frecvent *virus*“...*

„Dimensiunile acestor germeni sînt probabil vecine cu cele ale lungimii de undă a luminii, pentru a le vedea ar trebui construit un aparat care să folosească radiații cu lungime de undă mică... Cred că dacă acestea ar trece printr-o lupă și s-ar proiecta pe o placă fotografică am putea prinde imaginea acestor ființe minuscule“...

Și această afirmație, această ipoteză, desigur hazardată pentru acei ani, poate fi considerată de excepțională anticipație dacă ne amintim de confirmarea adusă ulterior (între 1938—1940) de microscopul electronic.

Se poate afirma că, încă din prima și a doua decadă a secolului al XX-lea, virusologia a început să se impună, practic, ca o nouă disciplină, distinctă — chiar dacă inițial, în sînul microbiologiei — căci se dovedea a avea un obiect de studiu propriu și metode specifice din ce în ce mai perfecționate.

---

* Se pare că termenul de *virus* provine din antichitate și a fost folosit prima oară, în descrierea turbării, de către Cornelius Celsus (100 e.n.), care a dat această denumire „balelor“ cîinelui turbat. De-a lungul timpului, numeroși infecționiști au utilizat termenul de virus, fie pentru a desemna un agent infecțios viu, opus „miasmelor morbide“ — din teoria miasmatică — Jean Hameau (1842) —, fie chiar germeni microbieni — văzuți la microscop — P. F. Rayer, C. Davaine (1850) —, care scriau despre „virusul cărbunos“ *(B. anthracis)*. În accepțiunea sa actuală, dar sub denumirea de „virus filtrabil“, noțiunea s-a impus abia către anii 1910—1912 (N.A.).

Ideea că acel *contagium vivum et fluidum* ar fi o toxină a fost repede abandonată, chiar de către Beijerinck, prin demonstrarea faptului că există o creștere cantitativă a „agentului patogen“, proprietate ce nu putea fi — în nici un fel — atribuită unei substanțe chimice oarecare. Ideea a fost acceptată și chiar confirmată teoretic de către J. McKendrick și L. Errera reluînd calculele fizicianului Maxwell (se știe că acesta încercase să pună în acord calculele sale asupra dimensiunilor moleculare cu teoriile dominante ale fenomenelor eredității).

Pentru o confirmare definitivă a fost necesară apariția unui mare număr de descoperiri cruciale și acestea nu numai că nu s-au lăsat mult așteptate, dar apariția lor a adus date ce au reprezentat mereu puncte de plecare pentru noi clasificări și noi descoperiri (unele considerente inițial ca aparținînd chiar domeniului științifico-fantastic).

Desigur o însușire a lor este imposibilă, motiv pentru care, chiar cu riscul unor importante omisiuni, am ales doar cîteva care, poate subiectiv, ne apar mai sugestive, deschizătoare de drumuri în specialitate.

Cert este însă că virusologia s-a dovedit a fi o ramură a științei medico-biologice capabilă să descifreze — prin metode experimentale specifice — noi „secrete“ ale vieții, să identifice noi fenomene, unele de prim ordin pentru sănătatea omului, animalelor și plantelor. De altfel, deceniul al 8-lea al secolului a adus alături de descoperiri fundamentale de dimensiuni extraordinare și cunoașterea unor viroze apărute recent în orizontul cunoașterii, cum sînt, între altele, infecțiile cu retrovirusuri (SIDA) ș.a.

O cronologie a descoperirilor majore în domeniu reține așadar : primul virus oncogen — cel al sarcomului aviar (Rous, 1911) ; fenomenul de bacteriofagie (Twort ; d'Herelle, 1915—1917) ; fenomenul de lizogenie (Bordet, Ciucă, 1920) ; ultrafiltrabilitatea virusurilor (Levaditi și Nicolau, 1923) ; izolarea în stare cvasipură a TMV (Vinson, 1927), a bacteriofagilor (Schlesinger, 1934) (fapt ce a permis stabilirea naturii lor nucleoproteice și chiar a unei proporții aproximativ egale de proteină și ADN) ; cristalizarea sau, mai exact, obținerea în stare paracristalină a TMV (Stanley, 1935).

În afara acestor evenimente cruciale din istoria virusologiei sînt de reținut și alte descoperiri importante în domeniu. Astfel, se precizează caracterul imunității celulare în viroze (Levaditi și Nicolau, 1921) ; se descoperă „septinevrita“ virusurilor „neurotrope“ (Nicolau, 1927) ; se descriu caracteristicile multiplicării fagilor ca preludiu la folosirea lor în analiza genetică (Ellis și Delbrück, 1939) etc. În 1942, se obțin de către Luria și Anderson primele imagini electronomicroscopice ale fagilor T2 ; în 1945 se demonstrează mutațiile la fagi (Luria) iar în 1949 — fenomenul recombinărilor la virusurile bacteriene (Hershey-Rotman). În 1956, Gierer și Schramm și independent Frankel-Conrat demonstrează cu ARN extras din TMV infectivitatea acestuia, aducînd în actualitatea stringentă ideea „acidului nucleic viral infecțios“ și mai ales a informației ereditare complexe deținute în acizii nucleici virali. Aceasta la 4 ani după ce Hershey și Chase demonstraseră același fenomen în cazul ADN fagic.

Din acest moment, virusologia — care în afara descoperirilor citate înregistrase şi acumulase date remarcabile într-un număr de lucrări puţin întîlnit în alte discipline ştiinţifice — a păşit pragul maturităţii, devenind disciplina „de sprijin“ a biologiei moleculare, ai cărei principali „cobai“ au continuat să rămînă virusurile şi chiar „fracţiunile subvirale“.

Descoperirile făcute într-un ritm rar întîlnit au venit să schimbe rapid multe din direcţiile de dezvoltare ale medicinii, biologiei generale şi moleculare, agriculturii şi zootehniei şi să influenţeze chiar unele ramuri industriale aferente, cu reale implicaţii sociale ; sfera de acţiune s-a lărgit enorm, virusologia devenind o ştiinţă interdisciplinară de prim ordin. Ea a căpătat pentru medicină şi biologie — dacă folosim o expresie a lui Şt. S. Nicolau — echivalentul „a ceea ce reprezintă pentru fizica modernă fizica nucleară“.

Se poate afirma că, fără să abandoneze scopul său iniţial — acela de apărare a sănătăţii omului, animalelor şi plantelor — virusologia a luminat o serie de necunoscute legate de naşterea, structura şi devenirea materiei vii pe planeta noastră, poate chiar şi în univers. De altfel, în ultimele trei decenii numeroşi virusologi-patologişti au evadat din medicină şi s-au dedicat studiilor de biologie şi genetică moleculară, de evoluţionism, realizînd astfel o imprevizibilă joncţiune între studiul virusurilor (ca modele ale structurii şi funcţiilor materiei vii) şi filozofie. Este contribuţia pe care virusologia o aduce cunoaşterii umane în general şi culturii în mod special.

Cuceririle ultimilor ani şi care au adus în prim plan, printre altele, virusurile lente (Gajdusek, 1957 —1971), interferonii (A. Isaacs şi J. Lindeman, 1957), mecanismele transformării maligne celulare (Temin, Mitzutany ; Baltimore, 1970 —1971), infravirusurile (S. Nicolau, 1965), ingineria genetică, vaccinurile sintetice (Sella, Arnon ; Vias, 1977), chimioterapia „ţintită" prin intermediul lipozomilor sau a membranelor virusului Sendai, folosirea anticorpilor monoclonali în virusologie, precum şi numeroase dovezi de participare a unor virusuri la procesele neoplazice, la producerea unor cazuri de diabet — mai ales a celui juvenil —, la declanşarea unor boli de sistem nervos — chiar şi a unor boli psihice —, la unele sarcini patologice, la determinarea proceselor de ateroscleroză, a unor cazuri de astm infecţios etc., au dat o nouă şi impresionantă dimensiune virusologiei fundamentale şi aplicate.

*

Am socotit necesar ca în această scurtă introducere la primul volum din „Tratat de virusologie medicală“ să se prezinte succint şi unele contribuţii româneşti la crearea, fundamentarea şi dezvoltarea ulterioară a virusologiei.

O privire retrospectivă distinge astfel cîteva realizări empirice precum şi destul de numeroase contribuţii ştiinţifice, care s-au dovedit nu numai priorităţi în domeniu dar au deschis noi drumuri în virusologia medicală şi în ştiinţele de graniţă — biofizică, genetică moleculară, biochimie şi chimioterapie, oncologie etc.

Observaţia populară a făcut ca, încă din epoca preromană, să dăinuie procedeul variolizării oilor. Ţăranii români din anumite zone ale Transilvaniei (Mureş, Sălaj, Bihor) ajunseseră prin secolul al XV-lea chiar la un soi de vaccinare comparabilă cu cea jenneriană : scăldau copiii nou-născuţi (1—2 luni) în lapte muls de la vaci cu erupţie vaccinală sau frecau pielea spatelui cu o măturică îmbibată în acest lapte amestecat cu secreţie veziculo-pustuloasă. Aşa se face că variola nu a constituit pentru români o problemă atît de gravă cum a fost pentru ţările Europei apusene. Mai mult, în principate, s-a introdus variolizarea (via Constantinopol) cu cel puţin un secol înaintea introducerii ei în Anglia de către celebra Lady Montague (1717). Prima femeie din înalta societate munteană despre care se ştie că şi-a variolizat copiii este doamna Pulcheria Mavrocordat (1720).

Contribuţiile ştiinţifice româneşti în domeniu debutează însă odată cu cercetările lui Victor Babeş asupra rabiei (1883). Abordînd problema biologiei agentului patogen al turbării şi a interacţiunii acestuia cu diferite organe şi ţesuturi, Babeş a putut dovedi — concomitent cu italienii I. di Vestea şi I. Zagari — că virusul rabic progresează centripet pe calea nervilor (1887) (fenomen numit de C. Levaditi şi Şt. S. Nicolau neuroprobazie iar ulterior de Şt. S. Nicolau — septinevrită). Tot Babeş a studiat comportamentul virusului în medii disgenetice vii (în limfa de la batracieni şi peşti. Urmărind interacţiunea virusului rabic cu celula nervoasă el a descris încă din 1887 incluziile acidofile patognomice (denumite astăzi corpusculii Babeş-Negri) iar în 1892, modificările cunoscute sub numele de nodulii Babeş. În acelaşi domeniu pot fi grupate şi cercetările dedicate obţinerii unui virus fix înalt imunogen. După încercări mai puţin fructuoase (virus fix pe cobai, pe şoarecele alb), savantul a reuşit să obţină în 1888 „tulpina de virus rabic fix Babeş-Bucureşti", pornind de la o tulpină sălbatică izolată de la un lup turbat.

Pe linia aceloraşi preocupări, V. Babeş şi E. Puşcariu au introdus în profilaxia rabiei şi „vaccinul încălzit" (inactivarea virusului fix prin căldură). Lucrări importante au fost dedicate de savantul român metodologiei de preparare a măduvelor rabice, precum şi diferenţierii schemei de tratament în funcţie de locul, timpul şi gravitatea muşcăturii.

În domeniul imunoprofilaxiei turbării, Babeş este primul cercetător din lume care a descoperit virtuţile seroterapiei : iniţial prin tratamentul animalelor muşcate cu sînge hiperimun total (1889), apoi numai cu ser antirabic (1892). Reiese că Babeş este descoperitorul pe plan mondial al fenomenului de imunitate pasivă şi implicit al seroterapiei. Tot el a optimizat tratamentul clasic pasteurian asociind vaccinului cu virus fix seroterapia. „Metoda românească de tratament antirabic" care utiliza „vaccinul încălzit" plus ser hiperimun s-a dovedit superioară metodei clasice pasteuriene, mai ales în cazul muşcăturilor profunde de lup turbat sau a celor la faţă şi gît.

Un strălucit elev al lui V. Babeş, Constantin Levaditi (1874—1953) — de numele căruia sînt legate şi prestigioase cercetări de microbiologie (forma actinomicotică a bacilului tuberculozei), impregnaţia argentică a spirochetelor, ca şi descoperirea terapiei sifilisului cu preparate de bismut (1931) —, este unul din pionierii virusologiei. Încă din 1909 el reuşeşte, alături de K. Landsteiner, să dovedească transmiterea virusului poliomielitei la maimuţele superioare şi implicit filtrabilitatea agentului cauzal. Au urmat alte studii dedicate infecţiei poliomielitice, respectiv : prima reuşită a cultivării *in vitro* a virusului (1913) pe celule de ganglion spinal de maimuţă, argumente peremptorii asupra căii orofecale în infecţie (alături de C. Kling, în 1913), descoperirea stării de „purtător sănătos“ şi eliminator de virus, precum şi iniţierea diagnosticului serologic în poliomielită (alături de Netter, în 1913). Împreună cu elevul său Ştefan S. Nicolau, Levaditi a impus, între 1922—1927, o serie de cercetări care au dus şi la următoarele descoperiri : ultrafiltrabilitatea virusurilor prin membrane de colodiu, vehicularea virusurilor neurotrope (rabic, herpetic, neurovaccinal etc.) pe calea filetelor nervoase (fenomenul de septinevrită), acţiunea litică a unor virusuri asupra tumorilor (oncoliza virală), tropismul comun al unor virusuri pentru piele şi sistem nervos (concepţia ectodermozelor neurotrope), mecanismul imunităţii celulare virale etc.

Ştefan S. Nicolau (1896—1967), elev şi colaborator al lui Levaditi la numeroase cercetări privind biologia şi epidemiologia unor virusuri, a impus la rîndu-i orizonturi noi în următoarele domenii : neuroinfecţiile virale sterilizante nemortale (completare la lucrările anterioare efectuate cu C. Levaditi asupra neuroinfecţiilor virale sterilizante mortale) ; incluziogeneza virală ; pluralitatea virusurilor hepatitice ; starea de biofiţie — virus-biofit ; conceptul de infravirus şi cel de artrovirus ; numeroase lucrări originale în variolă-vaccină, turbare, boală Borna, herpes, febră galbenă, gripă etc.

În aceeaşi perioadă şi alţi oameni de ştiinţă români au înscris descoperiri de bază în virusologie, unele cu consecinţe imprevizibile pentru dezvoltarea biologiei în secolul al XX-lea. Astfel, în 1920, alături de J. Bordet, Mihai Ciucă descoperă fenomenul de lizogenie, deschizînd un nou orizont în înţelegerea interacţiunii dintre acizii nucleici virali şi cei celulari (prima observaţie mondială a fenomenului de integrare în genomul celular a unui material genetic străin). Studiul aprofundat al fagilor enterici şi al unor mycofagi, iniţiat între alţii şi de M. Ciucă, a condus la aplicarea lor largă în lizotipie.

Lui C. Ionescu-Mihăieşti (1883—1962) i se datorează prima observaţie mondială (1927) asupra aşa-zisului fenomen de „sexualitate“ la virusuri (în fond recombinare genetică la virusuri). I. Cantacuzino şi Olga Bonciu (1926) au făcut prima observaţie de transducţie şi conversie fagică, fenomen redescoperit şi studiat, în 1952, de D. M. Zinder şi J. Ledenberg. Lapinizarea virusului pestei porcine, premisă a creării actualelor tulpini lapinizate-vaccinale, este opera lui Alexandru Vechiu (1931), iar introducerea RFC-ului în diagnosticul de tip al virusului febrei aftoase — realizarea lui Al. Ciucă (1928). Alţi elevi ai lui C. Levaditi, între care N. M. Constantinescu, I. Mesrobeanu, N. Stamatin, ca şi numeroşi elevi ai lui Şt. Nicolau au publicat lucrări care au contribuit la elucidarea unor aspecte controversate ale virusologiei teoretice şi aplicate aducînd numeroase contribuţii originale. Este de reţinut că prima catedră de virusologie din lume a fost creată de Şt. S. Nicolau la Facultatea de medicină din Bucureşti (1941), iar Institutul de Inframicrobiologie înfiinţat în 1949, astăzi denumit Institul de Virusologie „Ştefan S. Nicolau“. este cronologic al doilea institut de profil pe plan mondial.

⁂

În încheierea acestei succinte introduceri dorim să facem cîteva precizări asupra concepţiei ce ne-a ghidat la redactarea acestui tratat de virusologie medicală.

În primul rînd am dorit să putem pune la dispoziţia specialiştilor virusologi, infecţionişti şi epidemiologi, a celor ce lucrează în laboratoarele de diagnostic microbiologic şi virusologic, a imunologilor dar şi a celorlalţi medici şi chiar a studenţilor în medicină şi biologie, o carte care să cuprindă alături de ultimele achiziţii teoretice şi practice ale virusologiei contemporane şi date ale virusologiei clasice, ca şi contribuţia şcolii româneşti de virusologie în acest domeniu.

Într-un prim plan am selectat capitole cu caracter general, iar în cel de-al doilea, capitole cu caracter special. În final am introdus sinteze privind participarea virusurilor în contextul etiopatogenic al unor boli ce afectează aparate şi sisteme. Vreau să sper că ele îşi vor dovedi utilitatea şi că vor contribui la prestigiul şcolii româneşti de virusologie, onorînd tradiţia ei.

Doresc totodată să mulţumesc cu recunoştinţă Editurii Medicale şi dr. Irina Beloiu, redactorul de carte, pentru contribuţia adusă la apariţia în bune condiţii a acestei lucrări.

Prof. dr. NICOLAE CAJAL

Membru corespondent al Academiei Române.
Membru al Academiei de Ştiinţe Medicale
Directorul Institutului de Virusologie
„Ştefan S. Nicolau“

Bibliografie selectivă

BABEŞ V. — Orv. Hetil., 1886, 34, 978—979.

BABEŞ V. — Studien über die Wutkrankheit, Virchow's Arch. path. Anat., 1887, 110, 562—601.

BABEŞ V., LEPP C. — Recherches sur la vaccination antirabique, Ann. Inst. Pasteur, 1889, 7, 384—390.

BABEŞ V. — Traité de la rage, Baillière et Fils, Paris, 1912.

BALTIMORE D. — RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses, Nature, 1970, 226, 1 209—1 211.

BEIJERINCK M. W. — Over den contagium vivum fluidum als oorzaak van de Vlekziekte der Tabaks bladen, Versl. gewone Vergad, Wis-en naturk., Afd. K. Acad. Wet. Amst., 1898, 7, 229—235.

BORDET J., CIUCA M. — Exsudates leucocytaires microbiennes transmissibles, C. R. Séances Soc. Biol., 1920, 83, 1 293—1 296.

CAJAL N., IFTIMOVICI R. — Din istoria luptei cu virusurile şi microbii, Edit. Ştiinţifică şi Pedagogică, Bucureşti, 1964.

CAJAL N., PORTOCALĂ R. — Activitatea științifică a academicianului Șt. S. Nicolau, în Ștefan S. Nicolau — Opere alese, vol. II, p. 9—22, Edit. Academiei R.S.R., București, 1973.

CAJAL N., NASZ I. — The Contribution of virology to the revolution in contemporary biology, Rev. Roum. Méd., Virol., 1973, 10, 109.

CAJAL N., IFTIMOVICI R. — Cîteva reflecții asupra activității lui Victor Babeș în bacteriologie, virusologie și parazitologie, în Victor Babeș — Opere alese vol. II, p. 7—22, Edit. Academiei R.S.R., București, 1980.

CANTACUZÈNE J., BONCIU O. — Modifications subies par des streptocoques d'origine non scarlatineuse au contact de produits scarlatineux filtrés, C.R. Acad. Sci. (Paris), 1926, 182, 1 185.

ELLIS E. L., DELBRÜCK M. — The growth of bacteriophages, J. Gen. Physiol., 1939, 22, 365—384.

FRAENKEL-CONRAT H. — The role of the nucleic acid in the reconstitution of active tabacco mosaic virus, J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 882—883.

GAJDUSEK D. C., ZIGAS V. — Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea : the endemic occurence of „Kuru" in the native population, New Engl. J. Med., 1957, 257, 974—978.

GAJDUSEK D. C., GIBBS C. J. Jr. — Transmission of two subacute spongiform encephalopathies on man (Kuru and Creutzfeld-Jacob disease) to New World Monkeys, Nature, 1971, 230, 588—591.

GIERER A., SCHRAMM G. — Die infecktiosität der Nucleinsaure aus Tabakmosaikvirus, Z. Naturforsen, 1956, 2, 138—142.

HAMEAU JEAN — Étude sur les virus, C.R. Acad. Sci. (Paris), 1842.

D'HERELLE F. — Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques, C.R. Acad. Sci. (Paris), 1917, 165, 373—375.

HERSHEY A. D., CHASE M. — Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage, J. Gen. Physiol., 1952, 36, 39—56.

IFTIMOVICI R. — Creația românească în biologia universală, Edit. Albatros, 1977.

IONESCU-MIHĂIEȘTI C., TUPA AL., WISSNER B., MESROBEANU I. — Études sur la polyomyélite en Roumanie (première mémoire), Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol., 1929, 2, 217.

ISAACS A., LINDEMAN J. — Virus interference — The interferon, Proc. R. Soc., 1957, 147, 258—267.

IVANOVSKI D. I. — On two diseases of tabacco, Lel'Khoz. Lésov, 1892, 169, 2, 108—121.

JENNER E. D. W. — An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae, Sampson Low, Lond., 1798.

McKENDRICK J. C. — President's address, Rep. Br. Ass., 1901, sept., 806—816.

LANDSTEINER K., LEVADITI C. — La transmission de la paralysie infantile aux singes, C. R. Séances Soc. Biol., 1909, 67, 592—594.

LANDSTEINER K., LEVADITI C. — Sur la paralysie infantile expérimentale, C. R. Séances Soc. Biol., 1909, 67, 787—789.

LEVADITI C. — Virus de la polyomyélite et culture de cellules in vitro, C. R. Séances Soc. Biol., 1913, 75, 202—205.

LEVADITI C. — Virus rabique et culture des cellules in vitro, C. R. Séances Soc. Biol., 1913, 75, 505.

LEVADITI C., NICOLAU S. — L'immunité dans les ectodermoses neurotropes, C. R. Acad. Sci. (Paris), 1921, 173, 749.

LEVADITI C., NICOLAU S. — L'immunité dans les ectodermoses neurotropes, C.R. Acad. Sci. (Paris), 1921, 173, 794.

LEVADITI C., NICOLAU S. — Vaccines et néoplasmes, C.R. Acad. Sci. (Paris), 1922, 184, 1 649.

LEVADITI C., NICOLAU S. — Filtration des ultra-virus neurotropes à travers les membranes en collodion, C.R. Acad. Sci. (Paris), 1923, 176, 717.

LÖFFLER F., FROSCH P. — Summaricher Bericht über die Ergebnisse der Untersuchen der Komission zur Erforschung der Maul — und Klauenseuche bei dem inst. f. Infektionskrankheiten in Berlin, Zbl. Bakt. Parasit., 1897, 1, 22, 257—259.

LURIA S., ANDERSON T. F. — The identification and characterization of bacteriophages with the electron microscope, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1942, 28, 127—130.

LURIA S. — Mutation of bacteria and of bacteriophage, în Phage and the Origins of Molecular Biology, J. Cairns, G. Stent și J. Watson (red.), Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol., 1966.

LWOFF A. — The concept of virus, J. Gen. Microbiol., 1957, 17, 239—254.

NICOLAU S., DIMANCESCU-NICOLAU O. — Sur les septinevrites à virus filtrables. La virulence et les modifications histologiques du système nerveux péripherique des lapins infectées par voie cérébrale avec le virus neuro-vaccinal, C.R. Séances Soc. Biol., 1927, 97, 1 702.

NICOLAU S., KOPCIOWSKA L. — Neuroinfections expérimentales mortelles, partiellement auto-stérilisées chez le lapin, C.R. Séances Soc. Biol., 1934, 115, 1 094.

NICOLAU S., CRUVEILHIER L., TRUCHE J. — Neuroinfection autostérilisée à virus de la maladie d'Aujeszky chez le chimpanzé, C.R. Séances. Soc. Biol., 1938, 129, 176.

NICOLAU S., DEREVICI A., CAJAL N. — Cercetări histopatologice și experimentale asupra ganglionului lui Gasser, Bull. Acad. Méd. Roum. Ser. Șt. Med., 1941, 1, 2.

NICOLAU S. — Hepatite epidemice inframicrobiene, Stud. Cercet. Inframicrobiol., 1950, 1, 33—71.

NICOLAU S. — Cancer și virusuri — Cîteva considerații privitoare la ipoteza virotică a cancerului, Edit. Academiei R.P.R., București, 1955.

NICOLAU S., CAJAL N. — Considerații asupra etiologiei virotice a cancerului, Stud. Cerc. Inframicrobiol. Microbiol. Parazitol., 1957, 8, 493.

NICOLAU S. — Acțiunea oncolitică a unor virusuri, Stud. Cerc. Inframicrobiol., 1960, 4, 529.

NICOLAU S. — Se poate vorbi de infravirusuri „oncogene"?, în Omagiu lui Ștefan Gh. Nicolau, p. 484—494, Edit. Acad. R.S.R. București, 1965.

PASTEUR L., CHAMBERLAND C., ROUX E. — Nouvelle communication sur la rage, Bull. Acad. Méd., 1884, 13, 337—344.

PASTEUR L., CHAMBERLAND C., ROUX E. — Sur la rage, Bull. Acad. Méd., 1884, 13, 661—664.

ROUS P. — Transmission of a malignant new growth by means of a cell free filtrate, J. Amer. Med. Assoc., 1911, 56, 198.

ROUX E. — Sur les microbes dits „invisibles", Bull. Inst. Pasteur, 1903, 1, 7—12 și 49—56.

SABIN A. B. — Present position of immunisation against polyomyelitis with live virus vaccines, Br. Med. J., 1959, i, 663—680.

SELA M., ARNON R. — From the Synthetic Polypeptides to Synthetic Vaccines — Antigenic Structure and Function, în Immunogenicity of Protein Antigens, Repertoire and Regulation, Sercarz E. E. și J. A. Berzofsky (red.), CRC Press. 1987, 1, 5—13.

SCHLESINGER M. — Reindanstellung eines Bakteriophagen in mit freiem Auge sichtbaren Mengen, Biochem. Z., 1933, 264, 6—12.

STANLEY W. M. — Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tabacco-mosaic virus, Science, 1935, 81, 644—654.

TEMIN H. M., MITZUTANI S. — RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus, Nature, 1970, 226, 1 211—1 213.

TWORT F. W. — An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses, Lancet, 1915, ii, 1 241—1 243.

VIAS G. N. — Hepatitis B. Vaccine, Maupas P., Guesrey P. (red.), North. Holland Publ. Co., Amsterdam, 1981.

VINSON C. G. — Precipitation of the virus of tabacco mosaic, Science, 1927, 66, 357—358.

2

Clasificarea virusurilor

2.1. ISTORIC

Acumularea logaritmică de noi informaţii asupra virusurilor cunoscute precum şi descoperirea continuă a unui important număr de noi agenţi virali implică revizuiri periodice ale clasificării virusurilor. Această sarcină este de competenţa Comitetului Internaţional asupra Taxonomiei Virusurilor (sintagma engleză : ICTV), organism specializat al Uniunii Internaţionale a Societăţilor de Microbiologie. Ultima revizuire (a 5-a ediţie a clasificării) a avut loc cu ocazia Congresului Internaţional de Virusologie de la Sendai (Japonia, 1984). Este de aşteptat ca noi completări să fie aduse după cel de-al IV-lea Congres Internaţional de Virusologie, din 9—15 august 1987 (Edmonton, Canada), unde un simpozion special — „Taxonomia virală, relaţii deduse din stabilirea homologiei între secvenţele genomice" — va contribui la introducerea unui nou concept în legarea toxonomiei de evoluţie.

Premisele clasificărilor actuale au fost stabilite încă din 1962 (Lwoff, Horne, Tournier). În general, s-a adoptat o logică aristotelică, în sensul că „un lucru specific trebuie să aibă un singur nume specific, care să desemneze o categorie reală, şi nu arbitrară. O categorie există în virtutea unei definiţii" (Aristotel). Definiţia este bună în raport cu semnificaţia criteriilor alese. Cu cît numărul acestora este mai mic, categoria este mai bine definită. Clasificarea în vigoare reflectă tocmai o circumscriere a celor mai importante criterii. Urmărirea succesivă a diferitelor etape pe care le-a parcurs studiul taxonomic ilustrează progresul cunoştinţelor noastre, de la o epocă nebuloasă a unei clasificări „viroastronomice" (Andrews şi colab., 1961), la datele sistematice actuale.

O taxonomie nu trebuie să fie o schemă rigidă în care noul material informaţional să nu-şi găsească locul ; ea trebuie să confere celui interesat un instrument de lucru şi, de asemenea, să ofere cadrul favorabil unor viitoare propuneri şi modificări.

2.2. CRITERII TAXONOMICE

Structura organizatorică a ICTV şi recomandările formulate de acesta oglindesc modul de clasificare a virusurilor.

ICTV cuprinde şapte subcomitete : pentru virusurile vertebratelor, ale nevertebratelor, ale plantelor, ale bacteriilor, ale fungilor, pentru proprietăţi şi date despre virusuri noi şi subcomitetul de coordonare. Primele cinci elaborează criterii şi clasificări independente, ceea ce nu înseamnă că între virusurile diferitelor regnuri nu se pot stabili relaţii. Capitolul de faţă se va limita numai la virusurile vertebratelor, insistînd asupra principalilor agenţi patogeni pentru om.

Recomandarea iniţială a ICTV, actuală şi în prezent, consideră virionul ca bază a oricărei taxonomii. Următoarele caractere fizico-chimice ale virionului sînt folosite pentru gruparea virusurilor în familii :

— natura chimică a acidului nucleic viral ;

— simetria capsidei ;

— prezenţa sau absenţa învelişului pericapsidar ;

— diametrul capsidei pentru virusurile cu simetrie helicoidală şi numărul de capsomere pentru virusurile cu simetrie cubică.

Concret, pe baza naturii chimice a genomului viral *phylum vira* se împarte în două *subphyla : dezoxivira* şi *ribovira,* cu genomul alcătuit din ADN, respectiv ARN. În funcţie de simetria capsidei — helicoidală sau cubică —, virusurile se grupează în clase : *dezoxihelica* şi *dezoxicubica, ribohelica* şi *ribocubica.* În continuare, clasificarea actuală se limitează numai la definirea familiilor, genurilor şi speciilor şi respectă următoarele reguli de nomenclatură :

1. La virusuri nu se aplică codul de nomenclatură bacteriană.

2. Nomenclatura este internaţională şi se aplică la toate virusurile, indiferent de regnul parazitat, în acelaşi mod.

3. S-a stabilit un consens privind acceptarea unei nomenclaturi latine cu terminaţiile : *viridae* pentru familii şi *virus* pentru gen. Numele latine existente se menţin ori de cîte ori este posibil.

4. Denumirea originală nu constituie o prioritate. Nu se folosesc nume de persoane în nomenclatură. Denumirile formate din iniţialele unor cuvinte (sigle) sînt acceptate dacă sînt semnificative pentru cercetătorii din domeniul respectiv. Ortografia siglelor este standardizată.

5. Definirea categoriei taxonomice „specie" este încă controversată în virusologie. Criteriile serologice aplicate în multe cazuri sînt insuficiente, astfel încît s-a optat pentru următoarea definiţie (1984) : „specia este o populaţie de virusuri conţinînd un grup de gene care le menţine distincte de grupurile de gene ale altor virusuri".

6. Genul este un grup de specii cu caractere comune iar familia — un grup de genuri cu caractere comune.

7. Nu mai este acceptată folosirea criptogramelor pentru indicarea speciilor de virus, ceea ce reflectă eşecul unei tentative de computerizare a nomenclaturii virale.

8. Sarcinile ICTV nu implică denumirea tipurilor și variantelor de virus. Grupuri ad-hoc de lucru sau laboratoare de referință au latitudinea să denumească aceste categorii (vezi denumirea virusurilor gripale stabilită de către Grupul de Experți OMS, 1980).

2.3. STADIUL ACTUAL AL CLASIFICĂRII VIRUSURILOR VERTEBRATELOR

Gruparea virusurilor asemănătoare în genuri și familii este bazată în prezent pe proprietățile fizico-chimice comune. Aceste proprietăți nu au o pondere egală în privința semnificației lor. Menționăm în continuare cîteva proprietăți considerate foarte importante :

a) Proprietăți vizînd acidul nucleic viral : masa moleculară, compoziția în nucleotide, conținutul procentual al acidului nucleic în virion, coeficientul de sedimentare și de flotație, prezentarea ca o singură moleculă sau ca o structură din fragmente articulate, prezența unei singure spire sau și a spirei complementare (acid nucleic dublu-catenar), forma liniară sau circulară a helixului, polaritatea pozitivă sau negativă a moleculei genomice în replicare.

b) Proprietăți vizînd polipeptidele virale : conținutul procentual al proteinelor în virion, numărul polipeptidelor structurale virus-codificate, numărul proteinelor implicate în replicare cu rol enzimatic, numărul de unități structurale proteice (capsomere) similare *per* virion, funcția proteinelor structurale, proteine structurale dependente de substratul de cultivare (codificate de genomul celulei-gazdă), activități virale specifice unor proteine structurale : hemaglutinină, neuraminidază, factor de sincițizare, activitate transformantă, polimeraze.

c) Proprietăți caracteristice lipidelor virale : conținutul procentual al lipidelor în virion, infuența substratului de cultivare asupra compoziției lipidelor, sensibilitatea infectivității la eter și detergenți.

d) Proprietăți vizînd unitatea structurală — virionul : dimensiunile virionului și forma acestuia, masa moleculară, coeficientul de sedimentare și de flotație, tipul de simetrie a nucleocapsidei, diametrul spiralei și lungimea pasului nucleocapsidei etc.

e) Proprietăți referitoare la mecanismul replicării virale : tipul de matriță pentru sinteza progenilor, caracteristicile ARNm, mecanisme de adsorbție și penetrare, sinteza proteinelor timpurii și tardive, evenimentele finale ale replicării : asamblare, eliberare, maturare.

Pentru ilustrarea principiilor taxonomiei virale ne vom referi la virusurile vertebratelor implicate în patologia umană. Pentru fiecare familie vor fi indicate doar elementele cele mai relevante, urmînd ca detalii să se găsească în capitolele părții speciale a tratatului. În tabelele 2-I și 2-II și fig. 2-1 și 2-2 sînt indicate principalele familii de ribo- și dezoxiribovirusuri, care vor fi analizate în acest capitol.

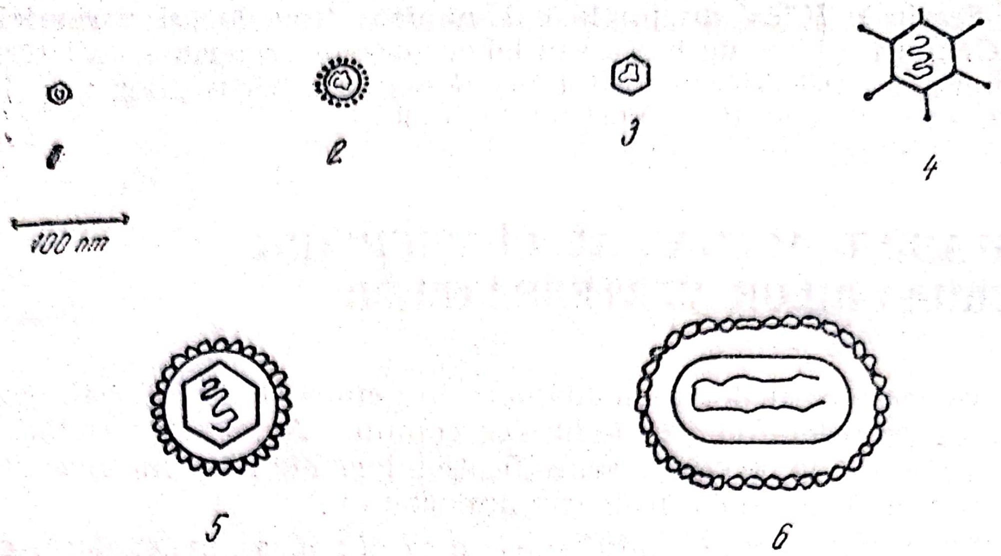


Fig. 2-1 — Morfologia virionului la principalele familii de dezoxiribovirusuri *(schemă)*.
1 — *Parvoviridae* ; 2 — *Hepadnaviridae* ; 3 — *Papovaviridae* ; 4 — *Adenoviridae* ; 5 — *Herpesviridae* ; 6 — *Poxviridae*.

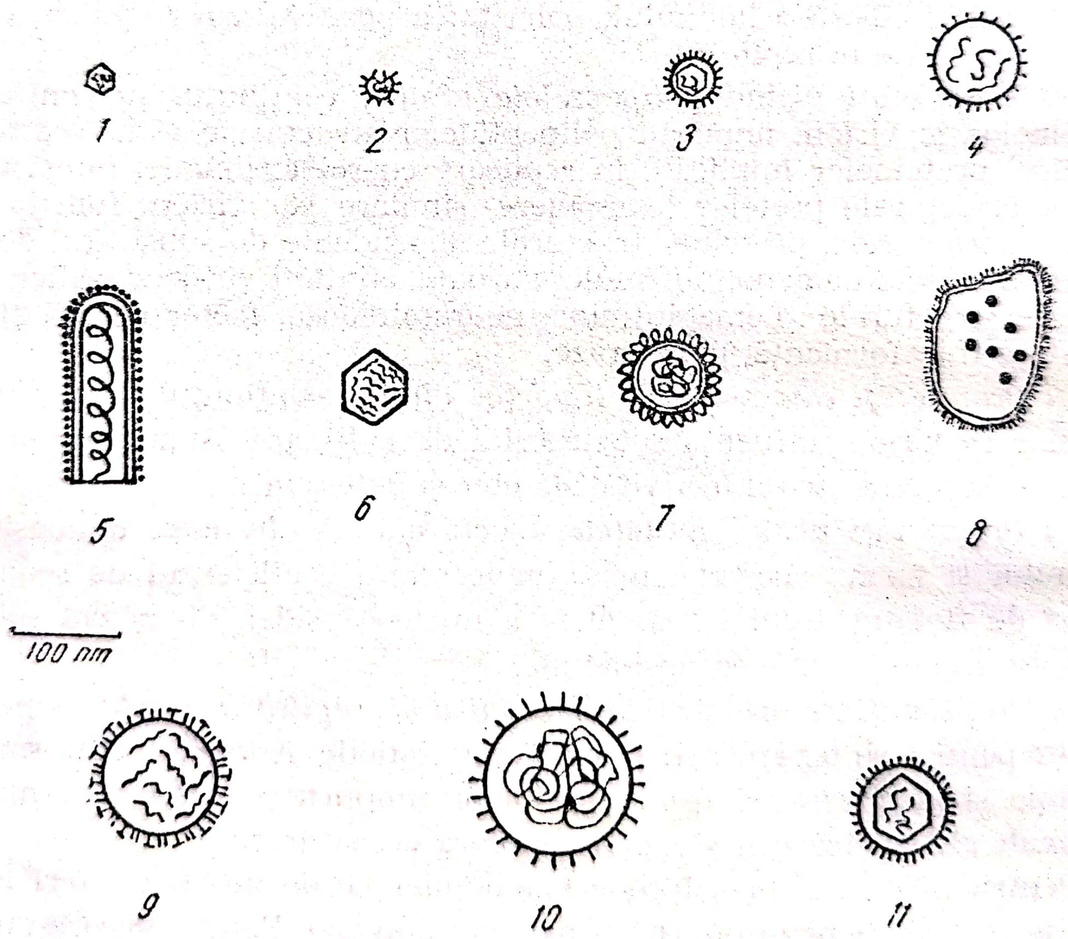


Fig. 2-2 — Morfologia virionului la principalele familii de ribovirusuri *(schemă)*.
1 — *Picornaviridae* ; 2 — *Caliciviridae* ; 3 — *Togaviridae* ; 4 — *Bunyaviridae* ; 5 — *Rhabdoviridae* ; 6 — *Reoviridae* ; 7 — *Coronaviridae* ; 8 — *Arenaviridae* ; 9 — *Orthomyxoviridae* ; 10 — *Paramyxoviridae* ; 11 — *Retroviridae*.

TABELUL 2-I

Caractere genomice şi structurale ale dezoxiribovirusurilor cu semnificaţie medicală

Familia	Dimensiunea virionului	Simetria capsidei	Nr. spire ARN	Helix ADN	Greutatea moleculară ARN (× 10^6 daltoni)	Nr. polipeptide codificate
Parvoviridae	18–26	Ic	1	L	1,5–2,2	3–4
Hepadnaviridae	40–50	H	2	C	3–5	4–5
Papovaviridae	45–55	Ic	2	C	3–5	5–7
Adenoviridae	70–90	Ic	2	L	20–25	30
Herpesviridae	180	Ic	2	L	100	160
Poxviridae	150–300	H	2	L	160–200	peste 250

Ic = capsidă icosaedrică ; H = capsidă helicoidală ; L = ADN liniar ; C = ADN circular.

TABELUL 2-II

Caractere genomice şi structurale ale principalelor familii de ribovirusuri

Familia	Dimensiunea virionului (nm)	Simetria capsidei	Nr. spire ARN genomic	Greutatea moleculară ARN (× 10^6 daltoni)	Nr. polipeptide codificate	Nr. segmente în genom
Picornaviridae	22–30	Ic	1	2,5	4–6	1
Caliciviridae	35–40	Ic	1	2,6	2	1
Togaviridae	40–70	Ic	1	4	10	1
Flaviviridae	70	Ic	1	4	10	1
Bunyaviridae	60–75	H	1	4,6	3	3
Rhabdoviridae	50–380	H	1	3,5–4,6	5	1
Reoviridae	60–80	Ic	2	12–20	11	11
Coronaviridae	75–160	H	1	6–8	30	1
Arenaviridae	60–300	H	1	6	10	5
Orthomyxoviridae	80–120	H	1	5	8	8
Paramyxoviridae	150–160	H	1	5,7	6	1
Retroviridae	80–100	H	1	10–12	>3	2

2.4. DEZOXIRIBOVIRUSURI

2.4.1. FAMILIA PARVOVIRIDAE

Familia *Parvoviridae* cuprinde trei genuri :

- *genul Parvovirus*, cu specia-tip *parvovirusul latent al şobolanului ;*
- *genul Dependovirus*, cuprinzînd virusurile *adenoasociate (adeno-associated viruses, AAV) ;*
- *genul Densovirus* — parvovirusuri ale insectelor.

Genomul parvovirusurilor conține cea mai mică cantitate de informație genomică între virusurile ADN. Genomul este o moleculă liniară de ADN monocatenar. Pentru replicare, membrii acestei familii necesită una sau mai multe funcții celulare generate în cursul fazei S tardive și G_2 a ciclului celular. Membrii genului *Dependovirus* reclamă în plus funcții celulare și virale determinate de replicarea concomitentă a adeno- sau herpesvirusurilor. Replicarea parvovirusurilor pornește de la genomul viral cu polaritate negativă și implică formarea unui intermediar replicativ ADN dublu-spiralat (ds). Din acest intermediar segregă spirele progene simplu-spiralate (ss). Eventual, acestea din urmă pot servi pentru transcriere funcționînd ca ARNm.

Parvovirusurile infectează latent culturi celulare. Pentru patologia umană este semnificativă incriminarea etiologică în a 5-a febră eruptivă a copilăriei dar, mai ales, în precipitarea crizelor aplastice din anemia falciformă sau drepanocitoză.

2.4.2. FAMILIA HEPADNAVIRIDAE

Familia *Hepadnaviridae* cuprinde *virusul hepatitei umane de tip B (HBV)*, precum și *virusuri hepatitice înrudite*, izolate la animale ca *Anas domestica* (rață), *Marmota monax, Spermophilus beeccheyi.*

Genomul viral constă din ADN dublu-spiralat parțial, circular, cu o crestătură (pană) în inel și o regiune simplu-spiralată. ADN polimeraza virală poate asigura întregirea moleculei către o formă circulară, dublu-spiralată complet. Mecanismul replicării implică un ARN intermediar, deci reverstranscrierea. Virionul, sferic, are un diametru de 42 nm, cu nucleocapsidă și anvelopă. Anvelopa, bogată în lipide, conține antigenul HBs (AgHBs) iar nucleocapsida ($\sim$27 nm) conține ADN viral, polimeraza și proteinkinaza. În acest nucleoid sînt cantonate antigenele HBc și HBe.

Pentru toți membrii grupului este caracteristic spectrul îngust de gazdă și tropismul restrictiv pentru hepatocite. O caracteristică biologică importantă este apariția frecventă a infecțiilor persistente. Similitudini structurale între genomul ADN al hepadnavirusurilor și ARN al retrovirusurilor explică oncogeneza virală și, posibil, rolul etiologic al HBV în carcinomul hepatic. Lucrări sintetice privind această familie au publicat la noi, în ultimul timp, V. T. Babeș (1984) și Monica Sabău (1987).

2.4.3. FAMILIA PAPOVAVIRIDAE

Familia *Papovaviridae* însumează două genuri :

- *genul Papillomavirus*, cu specia-tip *virusul papilomului Shope la iepure* și
- *genul Polyomavirus*, cu specia-tip *virusul polyoma la șoarece.*

Între cele două genuri deosebirea majoră o găsim în organizarea genomică : fragmente destinate citirii (cf. engl. *open reading frame*) pe o singură spiră și transcriere unidirecțională pentru papillomavirusuri și, invers, fragmente destinate citirii pe ambele spire și transcriere bidirecțională pentru polyomavirusuri. ADN viral este dublu-spiralat, cu o greutate moleculară de $3—5\times10^{6}$ daltoni. Replicarea, exclusiv intranucleară, se desfășoară după un mecanism comun cu celelalte virusuri ADN ds (herpes-, adenovirusuri) și cuprinde, foarte schematic, următoarele etape :

— transcrierea ADN cu ajutorul polimerazei II a gazdei în ARN cu mesaj policistronic ;

— clivajul ARN primar în ARNm și traducerea proteinelor timpurii ;

— replicarea ADN genomic și sinteza pe aceste matrițe a ARNm care codifică proteinele tardive (între care și cele structurale). Controlul temporal al succesiunii etapelor se face la nivel posttranscripțional și la nivelul traducerii.

Virionii au diametru redus (45—55 nm), simetrie cubică cu 72 de capsomere și sînt lipsiți de înveliș pericapsidar.

Fiecare virus are o gazdă proprie, producînd frecvent la gazdele naturale infecții latente. Multe tulpini au proprietăți transformante și oncogene, adesea la gazde diferite de cele naturale.

Pentru patologia umană, în afara virusului verucii vulgare — implicat etiologic și în papilomul laringian și în *kondyloma accuminata* — alte două tulpini sînt intens studiate. Este vorba de virusurile BK și JC, izolate de la bolnavi cu leucoencefalită progresivă multifocală, asociată, de obicei, unor stări imunosupresive severe.

Pentru detalii privind această familie, se poate consulta referatul lui K. J. Syrjänen (1987) privind biologia papillomavirusurilor umane și rolul lor în carcinogeneza cu celule scuamoase în epiteliul tractului genital.

2.4.4. FAMILIA ADENOVIRIDAE

Familia *Adenoviridae* cuprinde :

- *genul Mastadenovirus* (la mamifere) și
- *genul Aviaadenovirus* (la păsări).

Serotipurile adenovirale la om și la animale sînt sintetizate în tabelul 2-III.

TABELUL 2-III

Serotipurile adenovirale la om și la animale

Genul	Gazda	Numărul de serotipuri	Gazde probabile
Mastadenovirus	om	41	
	primate	24	caprine
	porcine	4	*opossum*
	bovine	9	
	ovine	5	
	canine	2	
	cabaline	1	
	murine	1	
Aviaadenovirus	găină	9	rață, fazan
	curcan	2	gîscă

Genomul adenoviral este ADN ds, liniar, cu greutate moleculară 20—30×10^6 daltoni. Virionii au diametrul mediu de 70—90 nm şi o capsidă cu simetrie cubică şi 252 de capsomere. Există 41 de tipuri antigenice umane, cu afinitate pentru mucoasele respiratorii (subgenul B), conjunctivale (D), digestive (C) şi pentru ţesuturile limfoide (tabelul 2-IV). Subgenul C dă frecvent infecţii latente iar subgenul A este oncogen, experimental. O sinteză asupra acestei familii a publicat Doerfler, în 1983.

TABELUL 2-IV

Clasificarea adenovirusurilor umane

Subgen	Serotipuri	Activitate hemaglutinantă*	Lungimea proiecţiilor lungi (nm)	Oncogenitate la hamster nou-născut
A	12, 18, 31	tip IV	28—31	Înaltă (în 4 luni)
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35	tip I	9—11	Slabă (în 4—18 luni)
C	1, 2, 5, 6	tip III	23—31	Numai activitate transformantă *in vitro*
D	restul	tip II	12—13	
E	4	tip III	17	Absentă
F	40, 41	tip IV	28—33	Absentă

* Hemaglutinarea de tip I — completă cu hematii de maimuţă ; de tip II — completă cu hematii de şobolan ; de tip III — parţială cu hematii de şobolan (puţini receptori) ; de tip IV — evidentă cu hematii de şobolan numai după adăugarea în sistem a serului heterotipic.

2.4.5. FAMILIA HERPESVIRIDAE

Familia *Herpesviridae* este atît de complexă încît a fost necesară crearea a trei subfamilii :

— *Subfamilia Alphaherpesvirinae* cuprinde două genuri :

- *genul Simplexherpesvirus*, cu specia-tip *virusul herpetic uman 1* (oral) (HSV-1) şi care mai cuprinde HSV-2 (genital) şi *virusuri herpetice de la cercopiteci* (tipurile 1 şi 2) ;
- *genul Varicellavirus*, cu specia-tip *virusul herpetic uman 3 (virusul varicella-zoster*, VZV). Alte herpesvirusuri incluse în acest gen sînt *virusul pseudorabic (suid herpesvirus 1)*, plasat anterior într-un gen separat *(Poikilovirus)*, şi *equid herpesvirus 1*.

— *Subfamilia Betaherpesvirinae* cuprinde două genuri :

- *genul Citomegalovirus uman* (CMV) *(virusul herpetic uman 5)*;
- *genul Citomegalovirus murin.*

— *Subfamilia Gammaherpesvirinae* este constituită, deocamdată, din trei genuri :

- *genul Lymphocryptovirus*, cu specia-tip *virusul herpetic uman 4 (Epstein-Barr)* (EBV) ;

- *genul Thetalymphocryptovirus*, cu specia-tip *virusul herpetic gallid 2 (virusul bolii Marek)*;
- *genul Rhadinovirus*, care conține patogeni tropicali extrem de periculoși și pentru om: *herpesvirus ateles* și *saimiri*.

O complexitate deosebită are structura genomului herpetic, ADN ds, liniar, cu patru forme izomerazice. Greutatea moleculară se apropie de 100×10^6 daltoni. În afara ADN, nucleoidul herpetic mai conține proteina VP21 și histone. Mergînd spre regiunea exterioară a virusului, se descriu următoarele structuri: capsida, „tegumentul“ și anvelopa lipoproteică cu proteine glicozilate. Replicarea herpesvirusurilor cuprinde evenimente în mare parte lămurite recent și care individualizează, alături de alte elemente, subfamiliile și genurile menționate. Astfel se explică și patologia umană extrem de diversă în care virusurile herpetice au fost implicate. O lucrare de sinteză asupra nomenclaturii și biologiei herpesvirusurilor a fost publicată recent (Roizman, 1979, și Roizman și colab., 1981). Caracterele distinctive ale subfamiliilor de herpesvirusuri sînt redate în tabelul 2-V.

2.4.6. FAMILIA POXVIRIDAE

Familia *Poxviridae* cuprinde două familii:

— *Subfamilia Chordopoxvirinae* (ale vertebratelor);
— *Subfamilia Entomopoxvirinae* (ale insectelor).

Pentru patologia umană sînt importante două genuri din prima subfamilie:

- *genul Orthopoxvirus*, cu specia-tip *virusul vaccinal* [alți membrii: *virusul variolei umane* (eradicat), *virusul ectromeliei la șoarece, virusul variolei la maimuțe* etc.];
- *genul Parapoxvirus*, cu specia-tip *virusul Orf* (al dermatitei pustuloase contagioase). În acest ultim gen sînt încadrate și *virusul paravaccinal* (care determină „nodulii lăptarului“) și *virusul stomatitei pustuloase bovine*.

În funcție de gazda afectată preferențial, în subfamilia *Chordopoxvirinae* au mai fost individualizate genurile: *Avipox-*, *Capripox-*, *Leporipoxvirus* (la iepure) — *virusul mixomului*.

Poxvirusurile sînt cele mai mari virusuri, cu aspect cărămidiform și dimensiunile paralelipipedului în jur de $300 \times 170 \times 260$ nm. Un înveliș extern complex înconjură 1—2 corpi laterali și un nucleoid dens care conține genomul ADN ds, cu greutate moleculară $80—240 \times 10^6$ daltoni. Acesta codifică informația genetică pentru peste 30 de proteine structurale și cîteva enzime. Din punct de vedere replicativ, poxvirusurile reprezintă un grup particular, pentru că unitatea replicativă este complexul dezoxiribonucleoproteic. Nucleoidul conține enzime proprii implicate în replicare: polimeraza ARN, DNaze, proteinkinaze. Informații suplimentare privind această familie pot fi găsite în lucrarea lui Baxby (1985).

TABELUL 2-V

Principalele caractere distinctive în subfamiliile de herpesvirusuri

Subfamilia	Spectru de gazdă	ECP în culturi celulare	Infecţii latente localizate în:
Alphaherpesvirinae	larg	litic rapid	ganglioni spinali
Betaherpesvirinae	îngust	lent progresiv	glande salivare etc.
Gammaherpesvirinae	foarte îngust	rareori litic, infecţii persistente	limfocite B

2.5. RIBOVIRUSURI

2.5.1. FAMILIA PICORNAVIRIDAE

Familia *Picornaviridae* cuprinde următoarele genuri (vezi tabelul 2-VI):

- *genul Enterovirus,* cu peste 70 de membri, incluzînd *virusurile poliomielitice ;*
- *genul Cardiovirus,* cu specia-tip *virusul encefalomiocarditei murine ;*
- *genul Rhinovirus,* care cuprinde peste 100 de agenţi ai guturaiului ;
- *genul Aphtovirus,* cu specia-tip *virusul febrei aftoase ;*
- *genul Hepavirus,* cuprinzînd *virusul hepatitei A* (HVA).

Genomul picornavirusurilor este alcătuit dintr-o moleculă liniară de ARN ss infectant, cu greutatea moleculară $2{,}5 \times 10^6$ daltoni.

Dimensiunea virionului este de 22—30 nm ; capsida, cu simetrie cubică, reprezintă un icosaedru cu 60 de capsomere. Învelişul pericapsidar lipseşte, picornavirusurile fiind rezistente la eter. Deosebirile între genuri se fac pe baza unor proprietăţi fizico-chimice şi serologice sumarizate în tabelul 2-VI. Capsida picornavirusurilor este compusă din 12 subuni-

TABELUL 2-VI

Principalele caractere distinctive între genurile familiei Picornaviridae

Genul	*Enterovirus*	*Cardiovirus*	*Rhinovirus*	*Aphtovirus*	*Hepavirus*
Serotipuri	70	1	110	7	1
Gazde principale	primate	rozătoare, alte vertebrate	om şi alte vertebrate	bovine, porcine, ovine etc.	om, primate superioare
Tropism enteric	sistem nervos central	cord, sistem nervos central	căi respiratorii	sistemic	ficat
Infectivitate la pH 3	stabilă	stabilă	labilă	labilă	stabilă
Densitate în CsCl g/cm³	1,33—1,35	1,34	1,38—1,41	1,43—1,45	

tăți complexe identice. Fiecare subunitate conține 5 copii pentru fiecare din cele 4 proteine structurale (VP1-4). În cursul morfogenezei virale, cele 5 copii se autoasamblează pentru a constitui 12 protomeri (14 S). Ulterior, aceștia se asociază în capsida goală (80 S), numită și protocapsidă. În final, se încorporează un singur ARN genomic, rezultînd virionul matur, infectant. Virusul hepatitei A conține numai 32 de capsomere în capsida care înconjură un ARN ss poliadenilat, lung de aproximativ 7,5 kilobaze, care funcționează și ca ARNm. Replicarea picornavirusurilor și a togavirusurilor se desfășoară după un model similar. Ambele au genomul ARN ss cu polaritate pozitivă, putînd deci servi și ca ARNm. Acest genom este infectant. Traducerea genomului produce o transcriptază ARN, care sintetizează mai multe spire cu polaritate pozitivă și negativă, conducînd la formarea unui intermediar replicativ dublu-spiralat ±. Traducerea mesajului policistronic al ARNm viral determină sinteza unui polipeptid precursor de aproximativ 250 kilodaltoni. Simultan cu sinteza precursorului au loc clivări consecutive mediate de proteaze ale gazdei, formîndu-se polipeptidele structurale.

Fiecare specie are, în mod natural, un spectru de gazdă îngust, care se lărgește la animale de laborator sau în condiții experimentale deosebite. În culturi de celule, folosind mai ales ARN infectant, infectivitatea picornavirusurilor își lărgește spectrul de gazdă considerabil.

O sinteză asupra nomenclaturii picornavirusurilor a publicat Cooper, în 1978.

2.5.2. FAMILIA CALICIVIRIDAE

Familia *Caliciviridae* a fost relativ recent individualizată și grupează virusuri umane, feline, porcine *(virusul exantemului vezicular porcin)*.

Genomul ARN ss, liniar, are greutatea moleculară $2,6 \times 10^6$ daltoni. Diametrul virionului (în formă de cupă) este de 35—40 nm, cu 32 de capsomere, fără anvelopă.

Un patogen important al omului, agent al unor gastroenterite virale, *virusul Norwalk* (27 nm), a fost afiliat calicivirusurilor, deși nu prezintă morfologia caracteristică. Genomul viral codifică o singură proteină structurală, de 59 kilodaltoni, și una adițională, solubilă, de 30 kilodaltoni. Alte virusuri similare, cu tropism enteric, au fost izolate de la om primind eticheta localității în care s-a înregistrat episodul epidemic : *Hawai, Marin County, Snow, Mountain*.

Studdert, în 1978, a sintetizat datele morfologice asupra calicivirusurilor.

2.5.3. FAMILIA TOGAVIRIDAE

Familia *Togaviridae* este taxonul cel mai cuprinzător desprins din vechiul grup al *arbovirusurilor* (fig. 2-3). Cuprinde următoarele genuri :

- *genul Alphavirus* (fostele arbovirusuri A), cuprinzînd *virusurile encefalitelor ecvine de Est și Vest ;*
- *genul Rubivirus*, cu un singur membru : *virusul rubeolic ;*

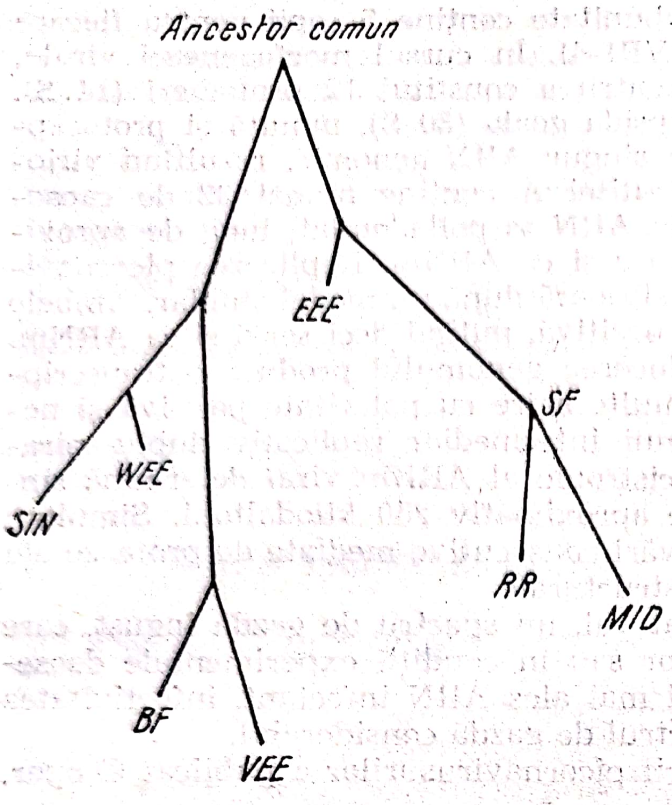


Fig. 2-3 — Arborele evolutiv la alphavirusuri. Lungimea segmentelor este proporțională cu distanța evolutivă (cu numărul modificărilor de aminoacizi între două virusuri, din datele de secvențiere a proteinelor structurale). *WEE* — encefalita ecvină de Vest (virus); *SIN* — virusul Sindbis; *BF* — bunyavirus (Barmah Forest); *VEE* — encefalita ecvină de Venezuela (virus); *EEE* — encefalita ecvină de Est (virus); *SF* — virusul Semliki Forest; *RR* — virusul Ross River; *MID* — virusul Middelburg.

- *genul Pestivirus*, cuprinzînd patogeni enterici la bovine;
- *genul Arterivirus*, cu specia-tip *virusul arteritei ecvine*.

Genomul togavirusurilor este un ARN liniar, monocatenar, cu greutatea moleculară de 4×10^6 daltoni. Capsida prezintă simetrie cubică cu anvelopă (sînt virusuri sensibile la eter).

Primul gen se replică la artropode (uneori transmițîndu-se transovarian) și la vertebrate. Celelalte genuri nu se replică la insecte iar pentru genul *Rubivirus*, omul este singura gazdă.

Dat fiind numărul mare de specii clasificarea togavirusurilor este în continuă schimbare (Mussagay și colab., 1975).

2.5.4. FAMILIA FLAVIVIRIDAE

Familia *Flaviviridae* a fost individualizată în 1984 și cuprinde agenții din vechiul grup arbovirusuri B, cu specia-tip *virusul febrei galbene (amaril)*. Patru subgrupuri antigenice sînt plasate în această familie:

1. virusurile encefalitelor transmise de țînțari (encefalita B japoneză, encefalita de St. Louis, encefalita Murray Valley etc.);

2. virusurile febrei Denga (boală tropicală acută, febrilă, cu raș, dureri musculare, limfadenopatie);

3. virusurile febrei galbene (boală tropicală acută, febrilă, cu icter, proteinurie, hemoragii);

4. complexul encefalitelor transmise de căpușe; în acest ultim grup intră agenți izolați și pe teritoriul țării noastre.

2.5.5. FAMILIA BUNYAVIRIDAE

Familia *Bunyaviridae*, ultimul taxon desprins din arbovirusuri, cuprinde aproximativ 100 de virusuri, avînd relații evolutive cu flavivirusurile.

Genomul acestor agenți este segmentat. Fiecare din cele trei segmente codifică proteine diferite ale virionului : nucleoproteina, glicoproteinele externe, alte proteine. Virionul, sferic sau oval, este mai mare decît la togavirusuri ; nucleocapsida helicoidală are proiecții externe, alcătuite din glicoproteine.

În genul *Bunyavirus* sînt cuprinse 13 grupuri de virusuri cu caractere serologice separate. Cel puțin 30 de virusuri din acest gen pot afecta omul. Altele infectează vertebrate homeoterme, poikiloterme sau insecte (Porterfield, 1976). Celelalte specii nu alcătuiesc un gen definit și sînt etichetate ca *Bunyavirus-like* (asemănătoare). Infecții epidemice cauzate de bunyavirusuri sînt : febra hemoragică de Crimeea, febra din Valea Rift etc.

2.5.6. FAMILIA RHABDOVIRIDAE

Familia *Rhabdoviridae* conține trei genuri, în care sînt clasificate și unele foste arbovirusuri :

- *Vesiculovirus,* cu specia-tip *virusul stomatitei veziculoase* (VSV) ;
- *Lyssavirus,* cu specia-tip *virusul rabic ;*
- *Filovirus,* care include *agenții bolii Marburg* și *Ebola* (în unele clasificări și în acest manual, genul este tratat ca o familie independentă : *Filoviridae*).

Genomul ARN ss, liniar, are o greutate moleculară de 3,5—4,6$\times 10^6$ daltoni și codifică 5 polipeptide majore (între care proteinele din structura proiecțiilor superficiale, transcriptaza, alte enzime). Virionul are o formă caracteristică — de glonț — cu dimensiuni de 130—380 nm lungime și 50—95 nm diametru. Spre deosebire de picorna-, toga- și bunyavirusuri, rhabdovirusurile (la fel cu ortho- și paramyxovirusurile) se comportă replicativ ca avînd genomul cu polaritate negativă. Aceasta înseamnă că, într-o etapă timpurie, transcriptaza virională sintetizează spira complementară pozitivă, care este apoi prelucrată în ARNm. Polimeraze ale gazdei servesc ca inițiatori, „primeri“, pentru transcrierea timpurie, ceea ce explică dependența replicării acestor virusuri de transcrierea ADN celular (replicarea este inhibată de actinomicina D etc.). Etapele ulterioare vor fi descrise la ortho- și paramyxovirusuri. De menționat spectrul extrem de variat al rhabdovirusurilor, care depășește cu ușurință chiar bariere de regn.

2.5.7. FAMILIA REOVIRIDAE

Familia *Reoviridae* cuprinde următoarele genuri :

- genul *Reovirus,* cu specia-tip *virusul REO 1* (există încă 2 tipuri antigenice) ;

- *genul Orbivirus*, cu specia-tip *virusul Blue Tongue* (și alte 17 subgrupe serologice);
- *genul Rotavirus*, care cuprinde agenți ai gastroenteritelor umane, simiene, bovine etc.

Genomul ARN ds conține 10—12 segmente, cu o greutate moleculară totală de 12—20×10^6 daltoni. Virionul este un icosaedru, cu diametrul 60—80 nm. Reovirusurile au 92 de capsomere, sînt lipsite de anvelopă și rezistente la eter, căldură, pH mai mic de 3. Ribonucleoproteina (virionul parțial decapsidat) constituie matrița replicativă pentru sinteza ARNm monocistronic. Pe acest ARNm se traduc proteine timpurii implicate în sinteza ribonucleoproteinelor progene.

Genul *Reovirus* infectează numai vertebratele, genul *Orbivirus* infectează insectele, dar și vertebratele, inclusiv omul. Rotavirusurile au un tropism limitat numai la epiteliul diferențiat constituit din enterocite. Manipularea lor genetică a făcut posibilă lărgirea spectrului de gazdă și cultivarea în culturi de celule.

Sinteze asupra acestor virusuri au publicat Joklik, în 1983, și Holmes, în 1983.

2.5.8. FAMILIA CORONAVIRIDAE

Familia *Coronaviridae* conține un singur gen — *Coronavirus* — cu specia-tip *virusul bronșitei infecțioase aviare*. Există coronavirusuri umane, aviare, porcine, feline, murine etc.

Genomul este un ARN ss, cu greutatea moleculară variind între 5,5—8,1×10^6 daltoni. Dimensiunile virionilor diferă, de asemenea, foarte mult: între 75—160 nm. Posedă înveliș pericapsidar și proiecții superficiale lungi (12—24 nm), ceea ce conferă aspectul de „coroană solară" imaginilor electronooptice.

Coronavirusurile sînt larg răspîndite în natură, spectrul bolilor produse la gazdele naturale, inclusiv la om, fiind divers: enterite, afecțiuni respiratorii acute, ale sistemului nervos central.

Detalii asupra acestei familii pot fi găsite în referatul lui Tyrell și Siddel (1978).

2.5.9. FAMILIA ARENAVIRIDAE

Familia *Arenaviridae* cuprinde, de asemenea, un singur gen — *Arenavirus* — cu specia-tip *virusul coriomeningitei limfocitare*.

Genomul, ARN ss, este segmentat (5 segmente). Virionul este sferic (60—300 nm), cu înveliș pericapsidar și proiecții glicoproteice. Aspectul arenavirusurilor este unic prin prezența unor granule opace la microscopul electronic, care sugerează grăunțele de nisip (cf. lat. *arena* = nisip).

În mod natural, cele mai multe arenavirusuri au o singură gazdă rozătoare, la care stabilesc o infecție persistentă cu viremie și/sau virurie, în funcție de răspunsul imun deficitar. Există dovezi care sugerează că virusul poate realiza un ciclu replicativ complet, fără a produce moartea celulară. Transmiterea în cadrul nișei naturale se face vertical : transovarian, transplacentar sau imediat post-partum (prin lapte, salivă, urină). Evadarea în afara nișei este neobișnuită și se face prin transmitere orizontală. În acest ultim mod poate fi afectat omul. Vectorii nu au rol în transmitere, cum eronat s-a sugerat la un moment dat.

Lucrările unui simpozion internațional asupra arenavirusurilor au fost publicate sub egida OMS, sub redacția lui Monath, în 1975. Datele au fost actualizate de Pedersen (1980).

Alte arenavirusuri aparțin complexului Tacaribe (Tacaribe, Machupo, Pichinde, Junin etc.). Între acestea, important pentru om este agentul unei maladii tropicale extrem de severe : febra Lassa.

2.5.10. FAMILIA ORTHOMYXOVIRIDAE

Familia *Orthomyxoviridae* cuprinde două genuri :

- *genul Influenzavirus*, cu două specii — *virusurile gripale A și B ;*
- *genul Mesainfluenzavirus* — *virusurile gripale de tip C.*

Separarea celor două genuri s-a bazat pe : *a)* virusurile de tip C au o neuraminidază de tip deosebit ; *b)* virusurile de tip C au o singură glicoproteină responsabilă pentru activitățile de legare și distrugere a receptorilor celulari și de fuziune celulară. De aici, existența a numai 7 segmente genomice la virusurile gripale C și a 8 segmente la virusurile gripale A și B. Prefixul *mesa* — sau *meso* — (cf. gr. *mesos* = mijloc) nu este cea mai fericită opțiune pentru etichetarea genului *Mesainfluenzavirus*, întrucît poate conduce la sugerarea unui grup intermediar între ortho- și paramyxovirusuri. De aceea este posibil ca în viitor denumirea să fie schimbată.

Clasificarea virusurilor gripale se face pe baza specificității de tip a nucleoproteinei și a antigenicității proteinei M *(matrix)*. Virusurile gripale de tip A sînt subîmpărțite în subtipuri pe baza caracteristicilor antigenice ale glicoproteinelor de suprafață : hemaglutinină (HA) și neuraminidază (NA). OMS recunoaște 13 subtipuri distincte după hemaglutinină și 9 subtipuri după neurominidază (tabelul 2-VII). În prezent se fac

TABELUL 2-VII

Taxonomia virusurilor gripale

Taxonul	Denumirea oficială internațională	Denumire curentă
Familia	*Orthomyxoviridae*	Grupul virusurilor gripale
Genul	*Influenzavirus*	Virus gripal
Specii	A	Exemple de tulpini : A/U.R.S.S./90/77 (H1N1) A/Texas/1/77 (H3N2)
	B	B/Lee/40 B/Singapore/79
Genul	*Mesainfluenzavirus*	
Specii	C	Exemple de tulpini : C/Taylor/II 33/47

eforturi pentru a se pune de acord nomenclatura internațională propusă de grupul de experți OMS (1980), cu criteriile taxonomice ale ICTV.

Genomul virusurilor gripale conține ARN ss, fragmentat, cu greutatea moleculară în jur de 5×10^6 daltoni. Virionul are diametrul între 80—120 nm, capsidă cu simetrie helicoidală și anvelopă cu proiecții (NA sau HA). Replicativ, ortho- și paramyxovirusurile au genom cu polaritate negativă. ARN^{m}_{*} (+), transcris pe matrița genomului, servește la sinteza polipeptidelor virale. Polimeraze ale gazdei sau oligonucleotizi scurți servesc ca inițiatori pentru transcriptaza virală. Replicarea ARN viral implică sinteza unor intermediari cu copii multiple pe matrița ARN negativă [intermediar ARN $(\pm)^{n}_{*}$]. Monografia lui Hoyle (1968) este încă un text de referință pentru virusurile gripale.

2.5.11. FAMILIA PARAMYXOVIRIDAE

Familia *Paramyxoviridae* cuprinde următoarele trei genuri :

- *genul Paramyxovirus*, cu specia-tip *virusul bolii Newcastle* (NDV) ;
- *genul Morbillivirus*, cu specia-tip *virusul rujeolic ;*
- *genul Pneumovirus*, cu specia-tip *virusul respirator sincițial* (RSV).

Alte specii importante pentru patologia umană sau veterinară, cuprinse în familia *Paramyxoviridae*, sînt sintetizate în tabelul 2-VIII.

TABELUL 2-VIII

Clasificarea paramyxovirusurilor

Genul	Specia-tip	Alte virusuri umane	Alte virusuri animale
Paramyxovirus	NDV	Virusuri paragripale tip 1, 2, 3 și 4 Virusul urlian	Virusuri paragripale simiene, bovine, murine, aviare
Pneumovirus	RSV	—	Virusuri sincițiale respiratorii simiene, bovine, murine
Morbillivirus	V. rujeolic	—	V. jigodios (cîine) ; V. pestei bovine ; V. minipestei ovine, caprine

Replicarea paramyxovirusurilor este similară cu a orthomyxovirusurilor. Anvelopa conține lipide derivate din membrana celulei-gazdă și expune proiecții superficiale cu activitate hemaglutinantă. Numai la genul *Paramyxovirus* același suport poartă și activitatea hemaglutinantă și neuraminidazică.

Maturarea virală este un proces multisecvențial, care implică preluarea proteinelor virale din membrana celulară, clivaje și glicozilări posttranscripționale ale acestor proteine. Toate aceste etape sînt critice pentru expresia patogenității virale. Unele virusuri din această familie au fost implicate în etiologia unor afecțiuni virale persistente. De exemplu, la om; panencefalita sclerozantă subacută, eventual și scleroza în plăci, ar fi determinate de virusul rujeolic.

Sinteze asupra paramyxovirusurilor au publicat Compans și Klenk (1979), Tyeryar (1983).

2.5.12. FAMILIA RETROVIRIDAE

Familia *Retroviridae* cuprinde trei subfamilii :

— *Subfamilia Oncovirinae* — virusuri tumorale ARN ;

— *Subfamilia Spumavirinae* — virusuri vacuolizante la mamifere ;

— *Subfamilia Lentivirinae* — agenți ai unor neuroinfecții lente.

Genomul retrovirusurilor este ARN ss, bisegmentat, cu greutate moleculară mare, $10—12 \times 10^6$ daltoni. Din punct de vedere replicativ, genomul are polaritate pozitivă și este asociat cu proteine structurale și enzime. Ultimele au activitate reverstranscriptazică și ribonucleazică. Reverstranscriptaza (RT) sintetizează o spiră ADN pe matrița ARN virală. O ADN polimerază și o ligază de origine celulară sînt implicate în formarea unui dublu helix ADN proviral, care se integrează în cromozomii celulari. Aici, provirusul se replică și suferă o transcripție asimetrică în ARN pozitiv genomic progen. ARN progen servește și pentru traducerea polipeptidelor virale.

Integrarea în cromozom este o etapă esențială în replicarea retrovirusurilor. La multe specii de mamifere, oncovirusurile se transmit vertical, mendelian. În unele cazuri, ele sînt asociate cu boli ca leucemii, limfoame, sarcoame, carcinoame mamare, ale ficatului etc.

— *Oncovirusurile* au fost clasificate de Bernhard (1960) în trei categorii de particule, după aspectul electronooptic (tabelul 2-IX). În funcție de spectrul lor de gazdă, virusurile de tip C se împart în :

- ecotrope — se replică numai în celulele gazdei originare ;
- xenotrope — se replică numai în celule diferite de specia originară ;
- amfotrope — cu caractere mixte.

TABELUL 2-IX

Clasificarea morfologică a oncovirusurilor (Teich, 1982)

Particule-tip	Talia (nm)	Morfologie	Mod de replicare	Exemple
A	75	Nucleoid translucid fără înmugurire	intracitoplasmatică fără înmugurire	Precursori ai tipurilor B și C
B	105	Nucleoid dens excentric	prin înmugurire	V. Bittner
C	100	Nucleoid dens central	prin înmugurire	V. Gross
D	100	Nucleoid excentric în formă de glonț	prin înmugurire	V. simian, Masson-Pfizer

La om, oncovirusurile au fost asociate sindromului de imunodeficiență dobîndită (SIDA) și unor limfoame sau leucemii. Nomenclatura agentului SIDA, fostul agent HTLV III/LAV, a fost modificată în *Human Immunodeficiency Virus* (HIV), existînd două subtipuri. Specii HIV au fost izolate și de la maimuțe (tabelul 2-X și fig. 2-4).

Sinteze recente asupra oncovirusurilor au publicat : Graf și Jaenisch (1982) și Vogt și Koprowski (1983). Lucrările asupra agenților HIV, extrem de numeroase, se perimează rapid.

TABELUL 2-X

Retrovirusuri umane

Denumirea	Sigla	Forme clinice determinate
Virusul leucemiei cu celule T-I	HTLV-I	*Mycosis fungoides*, sindrom Sézary
Virusul leucemiei cu celule T-II	HTLV-II	Leucemie cu celule „în arici"
Virusul imunodeficienței umane I	HIV-I	SIDA și sindromul asociat
Virusul imunodeficienței umane II	HIV-II	

Sinonime pentru HIV-I : HTLV-III, LAV 1 ; sinonime pentru HIV-II : HTLV-IV, LAV 2, SBL (înrudit cu virusul simian STLV-III).

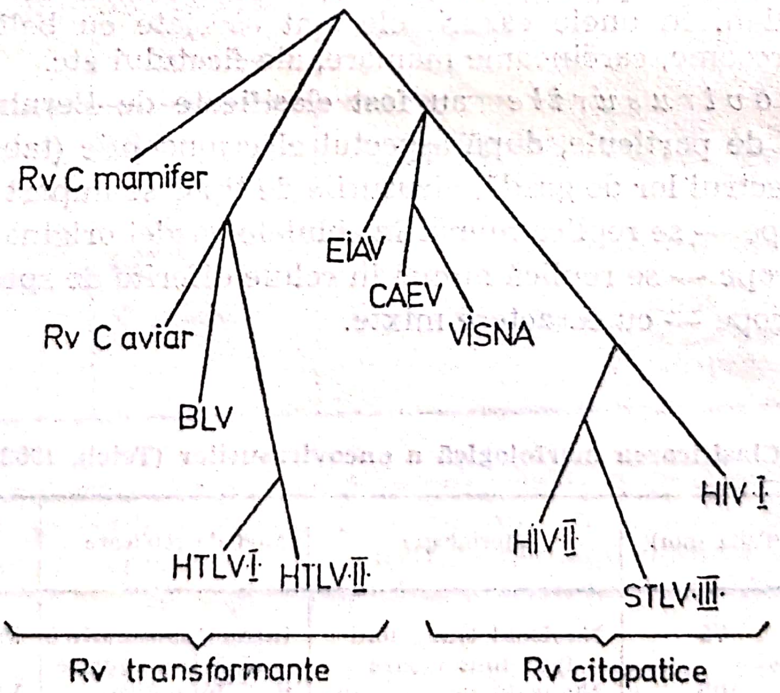


Fig. 2-4 — Relații evolutive între retrovirusurile transformante și citopatice.
RvC — particule retrovirale de tip C ; *BLV* — virusurile leucemiei bovine : *EIAV* — virusul anemiei infecțioase ecvine ; *CAEV* — virusul artritei caprine.

— *Spumavirusurile* infectează o varietate de mamifere, posibil și omul. Caracteristicile acestor infecții sînt : *a)* infecție persistentă în ciuda răspunsului imun al gazdei ; *b)* absența leziunilor patologice ; *c)* demascarea infecției prin cultivarea explantelor *in vitro*, unde „spontan“ apar sinciții vacuolante spumoase. Spumavirusurile nu determină transformarea celulară *in vitro* sau tumori la animale.

O sinteză asupra spumavirusurilor au publicat Hooks și Gibbs, în 1975.

— *Lentivirusurile* determină o patologie progresivă lent, care evoluează inexorabil letal după o incubație, de asemenea, foarte lungă (decade). În această subfamilie sînt incluse *virusurile Visna/Maedi* (la ovine) și agenții encefalopatiilor subacute spongiforme la om (exemplu : *agentul bolii Creutzfeldt-Jakob*). Semnificația acestor agenți pentru neurologie a fost sintetizată de Gajdusek, încă din 1977.

2.6. TENDINȚE RECENTE ÎN CLASIFICAREA VIRUSURILOR

Îmbogățirea metodelor tradiționale de caracterizare a virusurilor, care stau la baza clasificării prezentate mai sus, cu un spectru larg de tehnici genetice și moleculare, creează perspectiva unor clasificări mai apropriate, cu valoare teoretică, dar și epidemiologică. Aceste tehnici se referă, în primul rînd, la caracterizarea secvențelor nucleotidice ale genomului viral. Analiza electroforetică în gel PAGE-SDS a acizilor nucleici virali, cartografierea oligonucleotidelor în urma unor clivări enzimatice specifice, hibridizările pentru evaluarea homologiilor de baze și, în fine, determinarea ordinii de succesiune a secvențelor nucleotidice oferă argumente noi pentru stabilirea relațiilor între virusuri și pentru clasificarea noilor virusuri izolate. În al doilea rînd, compararea proteinelor virale prin procedee electroforetice și cromatografice, stabilirea secvenței de aminoacizi a unor proteine structurale reprezentative, analiza antigenică cu anticorpi monoclonali sînt metode indispensabile pentru diferențierea unor variante virale aparent identice și pentru stabilirea filiației lor.

Acumularea unui număr sporit de date este imposibil de stăpînit fără utilizarea sistemelor computerizate. Există cîteva centre în lume care mențin la zi bănci de date privind virusologia comparată. De exemplu, sub egida OMS funcționează la München un astfel de centru. Date asupra 16 familii de virusuri sînt grupate în șase secțiuni : taxonomie și reactivi disponibili, proprietăți structurale, proprietăți fizico-chimice și antigenice, diagnostic, infecții naturale și experimentale și date bibliografice. Datele pot fi obținute la cerere de către serviciile de sănătate publică naționale sau instituțiile de specialitate interesate (OMS, 1983).

O încercare de simplificare a parametrilor utilizați în taxonomie reia o inițiativă eșuată de criptogramare (Gibbs, 1966). Se preconizează construcția unui algoritm pentru clasificarea numerică a virusurilor vertebratelor (Ageeva și colab., 1985). Cu toate că în noua inițiativă se sporește numărul parametrilor înregistrați de la 8 la 61, clasificarea numerică menține o seamă de imprecizii, care provin și din considerarea unor parametri care aduc informații mai puțin semnificative.

În afara precizărilor unui domeniu atît de important teoretic, taxonomia va trebui să răspundă în viitor și unor probleme de interes fundamental, pe care clasificările altor regnuri le-au rezolvat. Este vorba, în principal, de originea și evoluția virusurilor.

Originea virusurilor, divers interpretată în timp, reține în prezent elementele esențiale ale teoriei evoluției regresive postulate de Burnet, în 1945. Potrivit și școlii profesorului Șt. S. Nicolau, virusurile sînt sisteme biologice care provin prin simplificare din organisme celulare, în urma unui parazitism avansat și prin dobîndirea unor noi caractere filogenetice legate de infectivitate. Evoluția permanentă a virusurilor este argumentată de datele noi de biologie moleculară și poate fi concepută la două niveluri : *macroevoluția* — extensia spectrului de infectivitate — și *microevoluția* — modificări structurale și antigenice ale virionului care infectează gazde noi, diferite de cea naturală. Indicarea căilor evolutive conferă dimensiuni noi, raționale, taxonomiei virale. Surprinzător este că, de multe ori, datele de biologie moleculară arată consistența efemeră a barierelor de specie sau de regn pentru evoluția virusurilor.

Bibliografie selectivă

AGEEVA O. N., ANDJAPARIDZE O. G., KIBARDIN V. M. — Vopr. Virusol., 1985, 30, 68.
ANDREWS C. H., BURNET F. M., ENDERS J. F. și colab. — Virology, 1961, 15, 52.
BABEȘ V. T. — Virusurile hepatitice, Edit. Academiei R.S.R., București, 1983.
BACHMANN P. A. — Intervirology, 1979, 11, 248.
BAXBY D. — Prog. Med. Virol., 975, 19, 215.
BERNHARD W. — Cancer Res., 1960, 20, 712.
BLACKLOW N. R., CUKOR G. — New Engl. J. Med., 1981, 304, 397.
COMPANS R. W., KLENK H. D. — Comprehensive Virology, p. 293, Plenum Press Inc., New York, 1979.
COOPER P. D. — Intervirology, 1978, 10, 165.
DOERFLER W. — Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1983, 109, 232.
GAJDUSEK D. C. — Science, 1977, 197, 943.
GIBBS A. J. — Nature, 1966, 209, 450.
GRAF T., JAENISCH R. — Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1982, 101.
HOLMES I. H. — În The Reoviridae, Joklik W. K. (red.), Plenum Press Inc., New York, 1983.
HOOKS J. J., GIBBS C. J. — Bacteriol. Rev., 1975, 39, 169.
HOYLE L. — Virology Monographs, vol. IV, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1968.
* * * — ICTV, Minutes of the Meetings of the Executive Committee, Londra, 1983 ; Sendai, 1984.
JOKLIK W. K. — Microbiol. Rev., 1981, 45, 287.
LWOFF A., HORNE R., TOURNIER P. — Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 1962, 27, 5.
MARION P. L., ROBINSON W. S. — Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1983, 105.
MATTHEWS R. E. F. — Intervirology, 1979, 12, 132.
MATTHEWS R. E. F. — Intervirology, 1982, 18, 1.

MONATH T. P. (sub red.) — Bull. World Health Organ, 1975, 52, 381.
MUSSAGAY M., ENZYMANN P. J., HORZINEK M. C. — Prog. Med. Virol., 1975, 19, 257.
PEDERSEN I. R. — Adv. Virus. Res., 1980, 24, 1.
PORTERFIELD J. S. — Intervirology, 1975/76, 6, 13.
ROIZMAN B. — Cell, 1979, 16, 481.
ROIZMAN B., CARMICHAEL L, E., DEINHARDT F. şi colab. — Intervirology, 1981, 16, 201.
SABAU M. — Epidemiologia hepatitelor virale, Edit. Dacia, Cluj-Napoca, 1987.
SIDDEL S. — Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1982, 99.
STUDDERT J. M. — Arch. Virol., 1978, 58, 157.
SYRJÄNEN K. J. — Med. Biol., 1987, 65, 21.
TEICH N. — În RNA Tumor viruses, Weiss R. (red.), p. 25, Cold Spring Harbour, 1982.
TYERYAR F. J. — *J. Infect. Dis.*, 1983, 148 (3), 588.
VOGT P. K., KOPROWSKY H. — Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1983, 106 şi 107.
* * * — WHO Memorandum, Bull. World Health Organ, 1980, 58, 585.
* * * — WHO Weecly Epidemiol. Rec., 1983, 58, 245.
WILDY P. — Monographs in Virology, p. 5, S. Karger, Basel, 1971.

3

Morfologia, structura și compoziția chimică a virusurilor

3.1. MORFOLOGIA VIRIONILOR

Virusurile reprezintă o familie deosebită de agenți infecțioși care diferă fundamental din punct de vedere structural și fiziologic de celelalte microorganisme. Lvoff a formulat ansamblul caracterelor comune ale virusurilor, făcînd posibilă discriminarea dintre virus și nonvirus, în special pe seama parazitismului absolut și obligatoriu al virusurilor.

Studiile de microscopie electronică au evidențiată existența unităților de bază virioni — corpusculi virali, care se prezintă ca particule dense, de forme și mărimi diferite. În ciuda diversității impresionante de forme, virusurile sînt alcătuite din doi constituenți principali și unul accesoriu, și anume: genomul viral, capsida și învelișul extern (fig. 3-1).

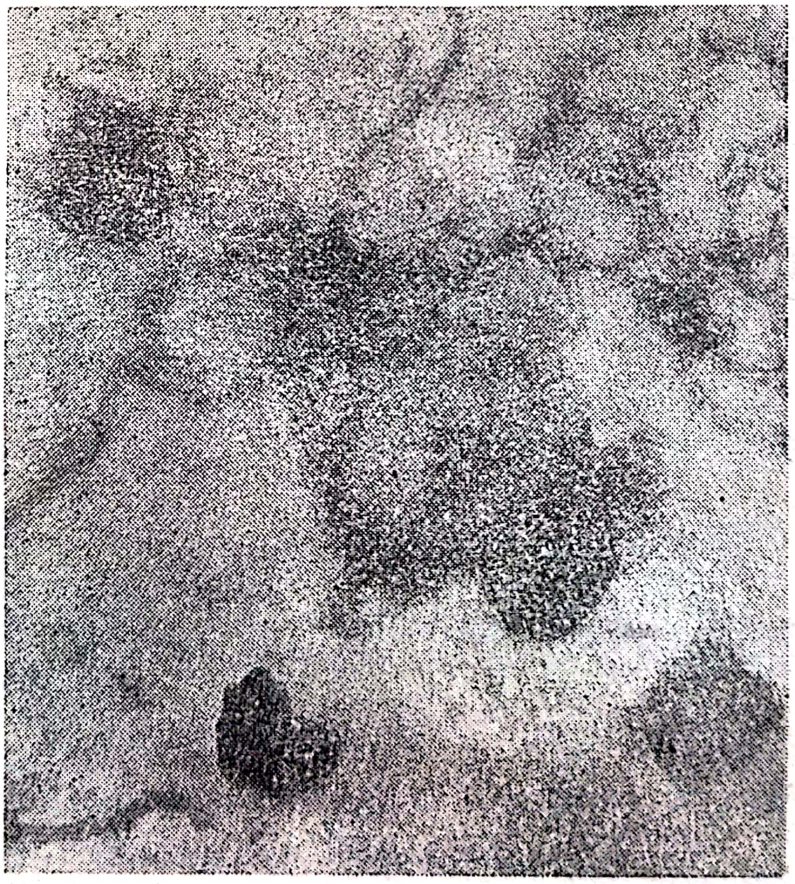


Fig. 3-1 — Virioni — virus paragripal tip 1 (Sendai) col. negativă ; ×120 000).

Genomul viral este alcătuit dintr-o moleculă de ADN sau de ARN, a cărui masă moleculară diferă de la un virus la altul, este liniară sau circulară, monocatenară (mc) sau bicatenară (dc), helicoidală, înfășurată sau pliată în scopul asigurării unei compactări maxime. Genomul este purtătorul informației genetice care determină în celula-gazdă replicarea proprie prin devierea metabolismului celulei parazitate în scopul componentelor virale și asamblării acestora. Prin aceasta, acidul nucleic viral este elementul determinant al infectivității virusului.

Capsida virală este constituită din unul sau mai multe tipuri de proteine care învelesc genomul viral. Acestea sînt dispuse în mod regulat, formînd structuri cilindrice, sferice etc., caracteristice tipului de virus. Datele existente atribuie capsidei rolul de protector al acidului nucleic față de acțiunea nucleazelor celulare, contribuind la fixarea și pătrunderea virusului în celula-gazdă. Datorită specificității proteinei virale, în interacțiunea cu zonele receptoare pentru virus ale suprafeței celulare, ea determină și spectrul de gazdă al virusului. De asemenea, specificitatea proteinei capsidei joacă rolul de determinant antigenic, dirijînd răspunsul imun al organismului invadat.

Ansamblul genom — capsidă formează nucleocapsida virusului.

O bună parte din virusuri conțin în structura lor și o membrană externă care învelește nucleocapsida. Funcția acesteia este atît de protecție a virusului, cît și de fixare a virusului pe suprafața membranei celulei-gazdă.

3.1.1. GENOMUL VIRAL

Masa moleculară a genomului viral variază în limite foarte largi, de exemplu de la 1,2—1,8$\times 10^6$ daltoni la paramyxovirusuri, pînă la cca 200$\times 10^6$ daltoni la poxvirusuri (fig. 3-2).

Natura acidului nucleic reprezintă o altă variabilă discriminatorie, întîlnindu-se virusuri cu genom ADN mono- și bicatenar. Diferențe mari se constată în dimensiunile acidului nucleic, masa moleculară, compoziția în baze, structura genomului (moleculară unică sau segmentată, cu seg-

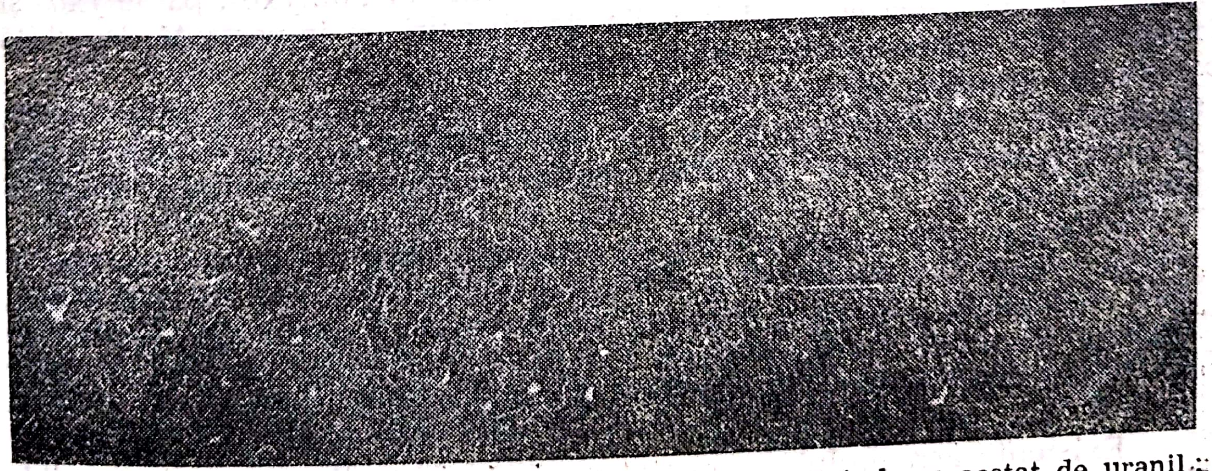


Fig. 3-2 — **Moleculă unică de ADN a virusului vaccinal (col. cu acetat de uranil; lungime totală cca 78 µm, echivalent cu aproximativ 160$\times 10^6$ daltoni) (după K. L. Egger și S. Dales).**

mente izolate sau legate cap la cap prin legături necovalente), forma acidului nucleic (liniară, circulară, superhelix, extremități adezive sau nu etc.).

Compoziția în baze a genomului este variată, atît între grupurile de virus, cît și în cadrul aceluiași grup, în limite largi, de exemplu la herpesvirus — între 46—74%.

În unele cazuri, virusurile replicate (progenii) pot prezenta fenomenul de „defectivitate“, unii corpusculi virali fiind lipsiți de genom sau cu genomul incomplet. În aceste cazuri, defectivitatea se corelează cu condițiile infectării, de exemplu cu creșterea raportului dintre numărul corpusculilor virali și numărul de celule-gazdă.

Virusurile cu genom ADN (dezoxiribovirusurile) prezintă șapte tipuri principale de structuri, din care pentru patogenia umană sînt întîlnite următoarele :

— genom monocatenar liniar — întîlnim la unele parvovirusuri ;

— genom dublu-catenar liniar repetitiv terminal — întîlnit la adenovirusuri ;

— genom dublu-catenar circular închis covalent, care duce la forma de moleculă superrăsucită *(supercoil)* — întîlnit la virusurile polyoma și SV40.

Virusurile cu genomul ARN (ribovirusuri) cuprind mai multe tipuri de structură, din care, de asemenea, interesant pentru patologia umană este cel cu genomul segmentat — întîlnit la reovirusuri (10 segmente), myxovirusuri (8 segmente).

Virusurile din această ultimă categorie sînt denumite „virusuri cu genom divizat“ sau „virusuri cu genom multipartit“ sau „virusuri multicomponente“, ținînd cont de faptul că materialul genetic este distribuit în mai multe particule nucleoproteice. Acestea, la rîndul lor, sînt incluse în două subcategorii : prima cuprinde virusurile la care capsida virală învelește mai multe segmente de ARN, diferite ca mărime și structură și care sînt replicate separat. Cea de-a doua cuprinde în special virusuri vegetale și la care segmentele de ARN nu sînt încapsidate împreună, ci individual, în mai multe capside.

Din prima subcategorie fac parte familiile orthomyxo-, paramyxo- și reovirusurilor, care cuprind tipurile de virusuri cu importanță deosebită în patologia umană și animală.

Virusul gripal, de exemplu, conține 8 fragmente de ARN monocatenar, cu mărime și structură diferite, care sînt replicate separat de celula-gazdă și care poartă informația necesară pentru sinteza componentelor virusului progen.

Reovirusurile conțin 10—12 segmente de ARN bicatenar, cuprinse în trei categorii de subunități : 3—4 subunități de cca 10 000 de nucleotide, care codifică sinteza polipeptidelor virale ; 10—20 de subunități mari cu ARN de transfer, cu rol presupus de „primer“ al transcrierii subunităților de ADN ; unele subunități mici, de 70—200 de nucleotide, cu rol încă neelucidat.

Existența genomului segmentat conferă virusurilor respective posibilitatea dobîndirii de noi caracteristici, determinate de recombinarea segmentelor genomice ale virusurilor diferite. După Gibbs și Harrison, această

„pseudorecombinare“ crește variabilitatea virusurilor, permițînd apariția de noi variante care pot învinge bariera imunologică dobîndită anterior. Cel mai ilustrativ exemplu este cel al orthomyxo- și paramyxovirusurilor, și în special al virusurilor gripale, la care s-a pus în evidență schimbarea unuia sau a mai multor segmente de ARN proprii cu segmente provenite de la unele tulpini aviare, porcine sau ecvine. Această schimbare reprezintă suportul marii variabilități a tulpinilor de virus gripal, determinînd fenomenele de *shift* și *drift* antigenic din cazul pandemiilor și al epidemiilor masive.

În ceea ce privește semnificația segmentării genomului, se presupune că ar reprezenta o mai bună adaptare la capacitatea celulelor eucariote de a traduce mesajul impus de virus. În general, este mai avantajoasă traducerea mesajelor mici oligocistronice, fie sub forma unor segmente de molecule de ARN într-o singură capsidă, fie sub forma mai multor capside mai mici. Această structură ar permite de asemenea traducerea simultană a genelor, asigurînd traducerea preferențială a celor necesare în cantitate mai mare.

Virusurile mici invadează mai ușor țesuturile, simplificînd trecerea virusurilor de la o celulă la alta.

Un fenomen cu înaltă semnificație biologică îl reprezintă capacitatea unor virusuri ARN (oncornavirusurile) de a se integra în genomul celulei-gazdă, producînd transformarea malignă a acesteia. Acestea realizează integrarea prin intermediul transcrierii la ADN dublu-catenar. După Joklik (1974), capacitatea de integrare a genomului viral în cel al gazdei reprezintă o funcție dobîndită, o adaptare extremă.

În anumite cazuri, și acidul nucleic celular se poate integra în genomul viral. La fagi sau la unele virusuri cu înveliș, prezența în genomul viral a acidului nucleic celular este fără efect asupra capacității acestora de multiplicare. În cazul virusurilor cu structură icosaedrică, încorporarea de acid nucleic celular se face în detrimentul unor acizi nucleici virali, ceea ce conduce la apariția de virusuri defective, ca în cazul papovavirusurilor.

Acizii nucleici virali au capacitate infectantă indiscutabilă pentru toate virusurile în care ARN polimerazele celulare îi pot transforma în ARN mesager sau care acționează ei înșiși ca ARN mesager. În ceea ce privește ARN al myxovirusurilor, dar și al rhabdovirusurilor și al reovirusurilor, capacitatea lor infectantă este încă subiect de discuție.

Există date care atestă că ARN virali care sînt transcriși la ARN mesager de polimerazele codificate de virus nu au infectivitate, dar sînt și cercetători care admit că înseși ARN polimerazele virusului (myxo- și paramyxovirusuri) îi pot transcrie la ARN mesager (Portocală). Faptul că, în general, infectivitatea acizilor nucleici virali este mai mică de 10^3—10^6 ori decît a virionilor din care sînt extrași creează probleme în obținerea de date indubitabile.

Scădera masivă a infectivității, ca urmare a extragerii și purificării acestora din virioni, se datorează mai multor factori, dintre care : degradarea rapidă a acizilor nucleici de către nucleazele extracelulare sau membranale ; modificarea structurală în timpul purificării ; dificultăți de fixare și pătrundere a acizilor nucleici pe și prin membrana celulelor-gazdă.

Pentru creșterea infectivității acizilor nucleici extrași se utilizează creșterea concentrației saline a soluției, complexarea cu policationi, protamină, DEAE-dextran, fosfat de calciu, ceea ce demonstrează rolul deosebit de important al capsidei sau al membranei virale în procesul de inițiere a infecției.

Pe de altă parte, creșterea spectrului de gazdă al acizilor nucleici izolați pledează în sensul rolului capsidei și al membranei virale în specificitatea de interacțiune virion — receptor celular specific.

3.1.2. CAPSIDA VIRALĂ

Se admite, pe criterii de microscopie electronică, că unitatea structurală a capsidei este constituită din unul sau mai multe lanțuri polipeptidice agregate, identice sau diferite.

La virusurile sferice, unitățile structurale formează grupări simetrice, unități capsomere sau unități morfologice.

Cercetări mai recente au permis avansarea conceptului după care unitățile structurale sînt fie polipeptide unice sau sînt formate din mai multe polipeptide care formează homo- sau heteropolimeri. La microscopul electronic se pot vizualiza unitățile structurale ale capsidei (capsomere), care variază de la un virus la altul, apărînd asociate în structuri cu simetrie helicoidală sau icosaedrică. Numărul unităților structurale, dimensiunile și forma lor sînt constante, fiind determinate genetic.

Masa moleculară a proteinelor capsidei variază într-un domeniu destul de larg (10^4—10^5 daltoni) fiind unică (de exemplu, virusul mozaicului tutunului) sau diferită (de exemplu, SV40 conține 3 proteine iar poxvirusurile cca 30 de proteine structurale diferite).

Majoritatea virusurilor conțin în interiorul capsidei proteine asociate cu genomul viral, alcătuind „nucleacidul“ viral și al cărui rol se presupune că ar fi acela de a menține acidul nucleic viral în formă condensată prin interacțiunile ce se stabilesc între cele două componente.

3.1.3. ÎNVELIȘUL EXTERN

Unele virusuri conțin și un înveliș extern alcătuit dintr-un dublu strat lipidic în care și pe care sînt implantate formațiuni glicoproteice cu aspect de spiculi, îndreptate spre exterior, și o proteină M pe fața internă a dublului strat.

Lipidele dublului strat provin din celulele-gazdă, fapt demonstrat de modificările constitutive ale membranei în funcție de tipul de gazdă pe care s-a multiplicat. Prezența glicosfingolipidelor, a acizilor grași cu număr mare de atomi de carbon în catenă și a colesterolului favorizează formarea de structuri legate strîns și care asigură învelișului viral un grad ridicat de organizare și rigidizare.

„Spiculii“ de natură glicoproteică „plutesc“ în masa dublului strat lipidic, fiind rigidizați prin forțe necovalente. Această structură oferă posibilitatea rearanjării lor în funcție de interacțiunile cu glicoproteinele membranei celulelor-gazdă prin mișcări de translație, rotație, scufundare, ranversare etc., determinînd interacțiuni atît între formațiunile glicoproteice apropiate, cît și cu cele de la distanță. Glicoproteinele de suprafață sînt specificate de virus, dar unele componente pot fi preluate direct de la membrana celulei-gazdă. Ele sînt alcătuite dintr-un lanț polipeptidic de care sînt legate covalent catene carbohidrate, de mărime și structură diferite, în constituția cărora intră îndeosebi galactoză, manoză, fucoză, N-acetilglucozamină, N-acetilgalactozamină etc. „Spiculii" respectivi sînt dotați cu activități biologice determinante în procesul de recunoaștere, de acolare și de penetrare a virusului în celula-gazdă. Astfel, în cazul myxovirusurilor există formațiuni diferite care asigură virusul activitățile hemaglutinantă și neuraminidazică.

Hemaglutininele (HA) au aspectul electronooptic al unor bastonașe de cca 16 nm lungime și 5 nm grosime, au formă prismatică cu baza triunghiulară și variază ca număr între 500—1 000/virion, în funcție de tipul de virus. Ele se găsesc în raport de aproximativ 5/1 față de neuraminidaze. Fiecare „spicul" este alcătuit din trei molecule de HA atît în forma clivată, cît și neclivată. HA reprezintă cca 1/4 din proteina virală, fiind o glicoproteină cu masă moleculară de cca 75 000—80 000 daltoni și care apare fie ca un singur lanț polipeptidic HA, fie ca un complex din două glicoproteine — HA1 și HA2 — de 50 000 daltoni și respectiv 30 000 daltoni (fig. 3—3). Datele existente sugerează că glicopeptidul HA este produsul primar codificat de gena virală, iar HA1 și HA2 sînt rezultanta clivajului proteolitic al HA. Glicopeptidul HA2, avînd o porțiune hidrofobă, este

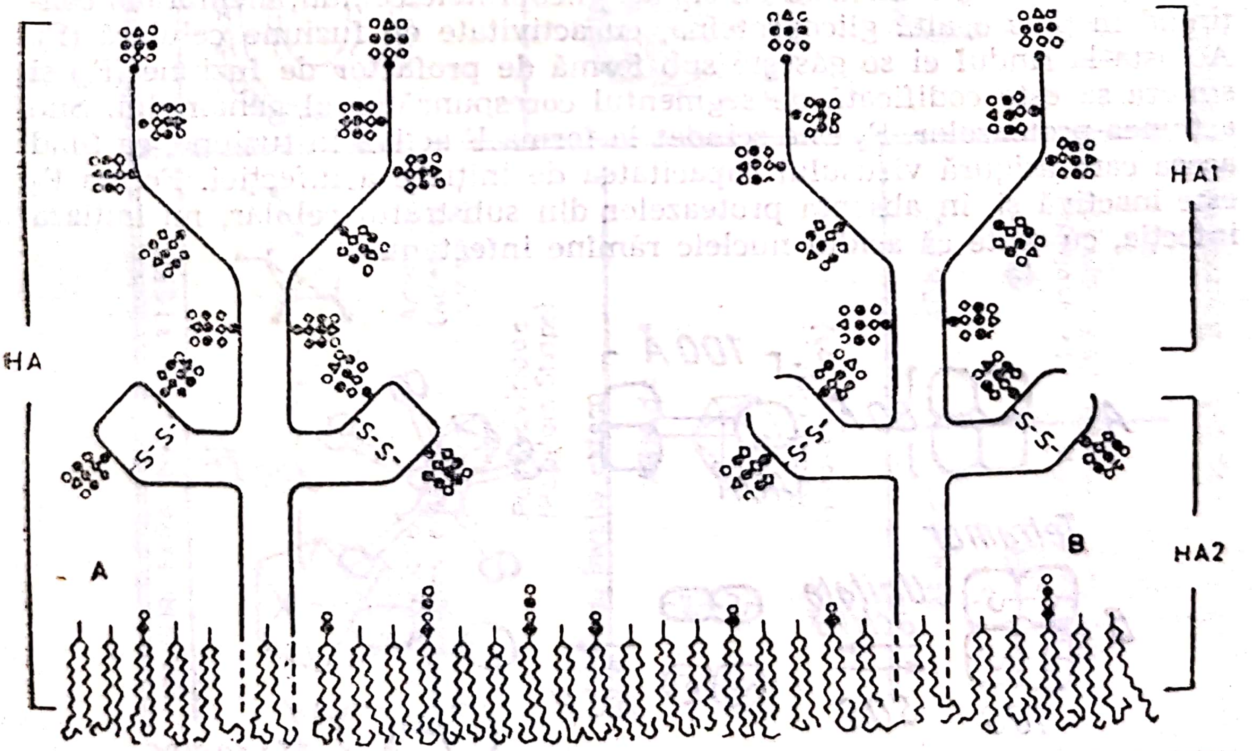


Fig. 3-3 — **Structura moleculară a hemaglutininei (HA) după modelul lui Klenk (1974). *A* — HA neclivată ; *B* — HA clivată în glicoproteinele HA1 și HA2 ; ● ◇ ○ ▽ — lanțuri laterale oligozaharidice legate de polipeptide ; ♦ ○ ● — zaharuri constitutive ale glicolipidelor.**

ancorat în stratul lipidic, iar porţiunea HA1 se leagă de HA2 prin intermediul punţilor disulfidice în cazul hemaglutininei active. Datorită structurii sale, hemaglutinina funcţionează ca antigen, determinînd apariţia de anticorpi specifici hemaglutinoinhibanţi.

Neuraminidaza (NA) este la rîndul ei o componentă glicoproteică, cu masă moleculară de 60 000 daltoni, codificată de segmentul corespunzător din genomul viral. „Spiculii“ cu activitate neuraminidazică au structură tetramerică cu masa moleculară de 240 000 daltoni. Se prezintă ca „un buton de manşetă“, cu capul de 8,5×5 nm, cu un picior lung de 10 nm şi diametrul de 4 nm. Numărul lor variază între 50—200/virion. Fiecare monomer de 60 000 daltoni este constituit din două subunităţi — NA1 şi NA2 — diferite, legate prin punţi disulfidice (fig. 3—4). Rolul lor este încă incomplet elucidat, dar datele existente converg în a le atribui rol în adsorbţia, penetrarea şi expulzia virusului. În faza acolării virusului la celula-gazdă, neuraminidaza acţionează asupra glicoproteinelor membranei-gazdă, care se caracterizează prin prezenţa NANA (acid N-acetilneuraminic)-terminală, desializîndu-le şi mărind numărul de terminaţii accesibile HA virale. Pe de altă parte, în momentul expulziei virionului, se constată că în zona de înmugurire dispare NANA-terminală, ceea ce face ca încorporarea materialului celular în structura virusului să se facă şi prin prelucrarea cu echipamentul propriu virionului. Este de altfel cunoscut că există similitudini între structura glicoproteică a membranei virale şi aceea a membranei celulare, cea a virusului fiind caracterizată prin absenţa NANA.

În cazul virusului paragripal tip 1 (Sendai), activităţile hemaglutinantă şi neuraminidazică au un suport glicoproteic comun, membrana conţinînd în plus o altă glicoproteină, cu activitate de fuziune celulară (F). Aceasta la rîndul ei se găseşte sub formă de profactor de fuziune (F_0) şi sinteza sa este codificată de segmentul corespunzător al genomului. Sub acţiunea proteazelor, F_0 este scindat la forma F activă în fuziune, ea fiind aceea care asigură virusului capacitatea de iniţiere a infecţiei. Forma F_0 este inactivă şi, în absenţa proteazelor din substratul celular, nu iniţiază infecţia, cu toate că acidul nucleic rămîne infectant.

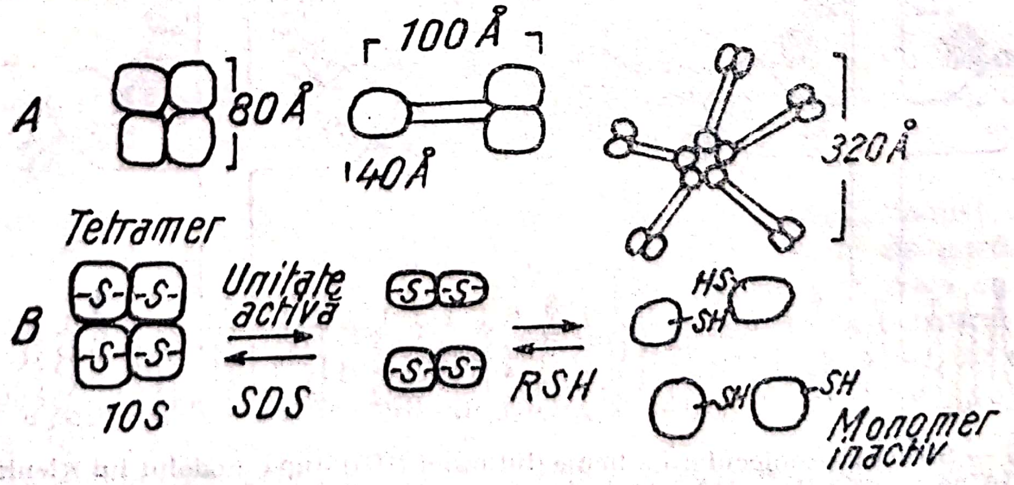


Fig. 3-4 — **Structura şi dimensiunile neuraminidazei virusului gripal.** *A* — **unitatea activă ;** *B* — **clivajul tetramerului punţilor disulfidice.**

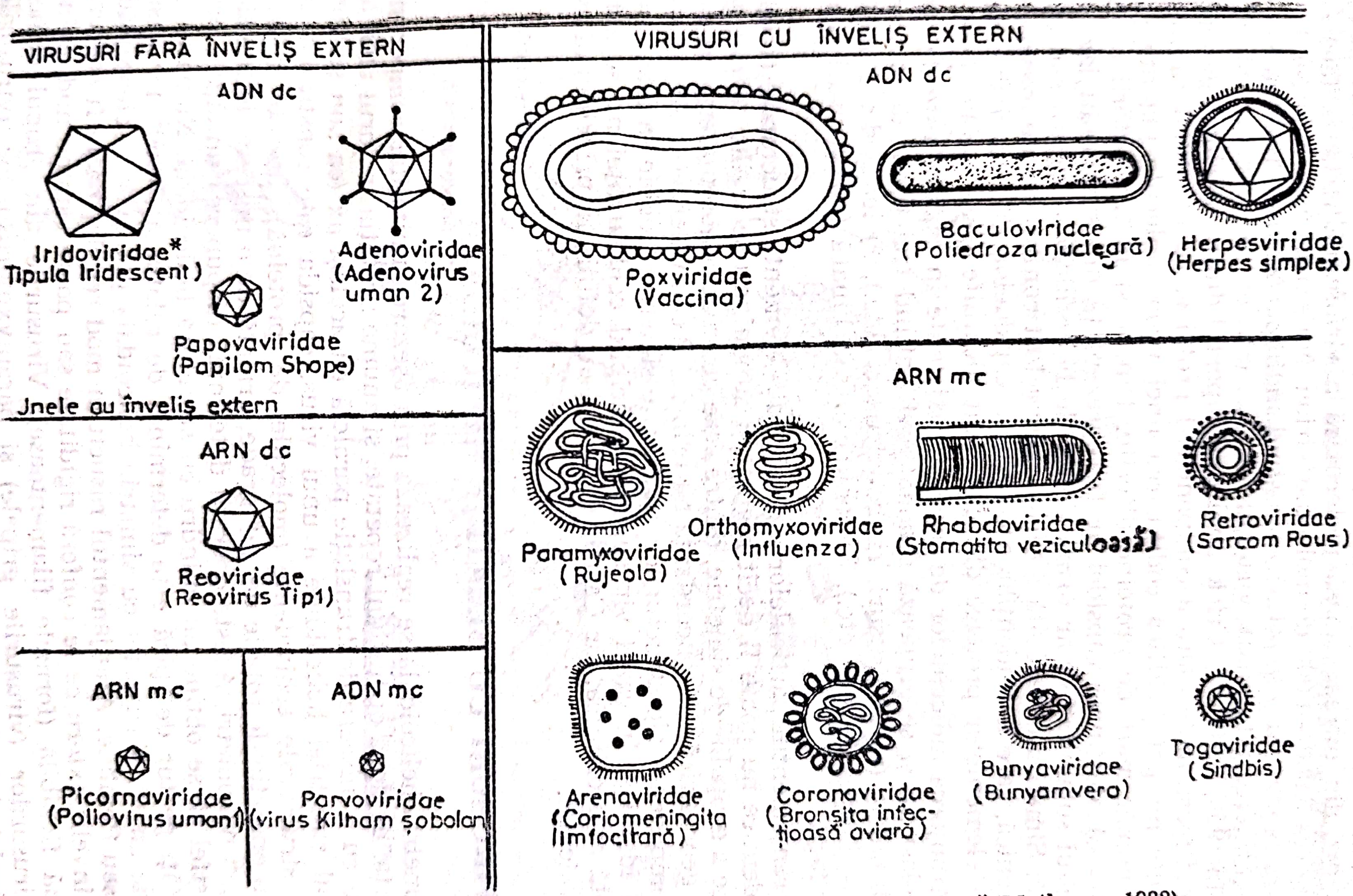

VIRUSURI FĂRĂ ÎNVELIȘ EXTERN
ADN dc
Iridoviridae*
(Tipula Iridescent)
Adenoviridae
(Adenovirus uman 2)
Papovaviridae
(Papilom Shope)
Jnele au înveliș extern
ARN dc
Reoviridae
(Reovirus Tip1)
ARN mc
Picornaviridae
(Poliovirus uman1)
ADN mc
Parvoviridae
(virus Kilham șobolan)
VIRUSURI CU ÎNVELIȘ EXTERN
ADN dc
Poxviridae
(Vaccina)
Baculoviridae
(Poliedroza nucleară)
Herpesviridae
(Herpes simplex)
ARN mc
Paramyxoviridae
(Rujeola)
Orthomyxoviridae
(Influenza)
Rhabdoviridae
(Stomatita veziculoasă)
Retroviridae
(Sarcom Rous)
Arenaviridae
(Coriomeningita limfocitară)
Coronaviridae
(Bronșita infecțioasă aviară)
Bunyaviridae
(Bunyamvera)
Togaviridae
(Sindbis)

Fig. 3-5 — Reprezentare schematică a unor virusuri animale (după Mathews, 1982).

În afara proteinelor membranei externe, unele virusuri mai conțin și așa-numita proteină M, localizată sub dublul strat lipidic. Masa ei moleculară este de cca 25 000 daltoni, fiind proteina cu cea mai mare pondere, cca 40% din întreaga masă moleculară a virionului. Aceasta face ca să existe cca 3 000—4 000 de molecule/virion. Nu există încă date certe referitoare la structura și rolul ei, existînd însă ipoteza unui rol determinant în menținerea integrității virionului.

În 1956, Watson și Crick, analizînd raportul dintre mărimea genomului viral și masa moleculară a componentei proteice, au constatat că valorile obținute nu pot justifica codificarea unei macromolecule gigante sau a unui număr mare de proteine diferite. Din acest motiv, autorii au emis ipoteza că alcătuirea capsidei ar fi reprezentată din subunități iar aranjamentul subunităților ar urma simetriile helicoidală și cubică sau cvasicubică. Simetria organizată a virusurilor a fost confirmată de microscopia electronică, care a evidențiat organizarea capsidelor prin aranjarea regulată a elementelor proteice din care sînt alcătuite (fig. 3—5).

Aranjarea moleculelor de proteină existente în capsidă este de obicei de același tip și se grupează ordonat, evidențiind trei tipuri de simetrie: *1)* helicoidală (myxovirusuri, rhabdovirusuri etc.), *2)* icosaedrică (polio-, adeno-, herpesvirusuri etc.), *3)* complexă sau binară (poxvirusuri și respectiv fagi).

Aranjamentul particulelor alcătuite din elemente structurale (subunități) identice nu poate fi decît regulat și supunîndu-se legilor teoriei geometrice a grupelor de simetrie, dintre care cea mai cunoscută este cristalografia geometrică. În concordanță cu principiul echivalenței, toate elementele componente ale structurilor organizate simetric trebuie să aibă o ambianță identică. În cazul virusurilor, principiul echivalenței nu se aplică cu toată rigurozitatea, iar Caspar și Klug l-au definit ca principiu al cvasiechivalenței.

3.2. VIRUSURI CU SIMETRIE HELICOIDALĂ

Simetria helicoidală se realizează prin așezarea unităților componente în funcție de două operațiuni repetate, și anume: rotația în jurul unui ax, cuplată cu o mișcare de translație paralelă cu același ax (ca „un șurub"). În cazul simetriei helicoidale a unui virus, capsida este constituită din unități structurale echivalente (molecule de proteină), așezate repetat printr-o operație de rotație de „n" grade, urmată de o mișcare de translație de „t" nanometri. Aceste operații determină dispunerea unităților proteice astfel că se obține un cilindru cu structură helicoidală. Numărul de subunități pe tur de spiră este determinat de relația $n = 360^\circ$, iar pasul elicei de „$n \cdot t$". Virusurile cu simetrie helicoidală pot avea nucleocapside rigide sau flexibile. Aranjamentul răsucit în mod regulat poate fi acoperit de un înveliș extern ce le conferă rigiditate sau poate rămîne nud, avînd o formă flexibilă (formele filamentoase). Virusurile din grupul orthomyxovirusurilor (virusurile gripale) și paramyxovirusurilor (virusurile paragripale) sînt virusuri de formă sferică, iar cele din grupul rhabdovirusurilor (virusul rabic), care au forma unui cartuș, reprezintă principalele virusuri întîlnite la om și care au simetrie helicoidală.

3.2.1. ORTHOMYXOVIRUSURILE

Virusurile gripale A, B, C sînt cele trei tipuri principale de orthomyxovirusuri umane (fig. 3-6).

În cadrul grupului A se întîlnesc mai multe subtipuri de virusuri, în funcție de existența deosebirilor calitative a două din componentele princi-

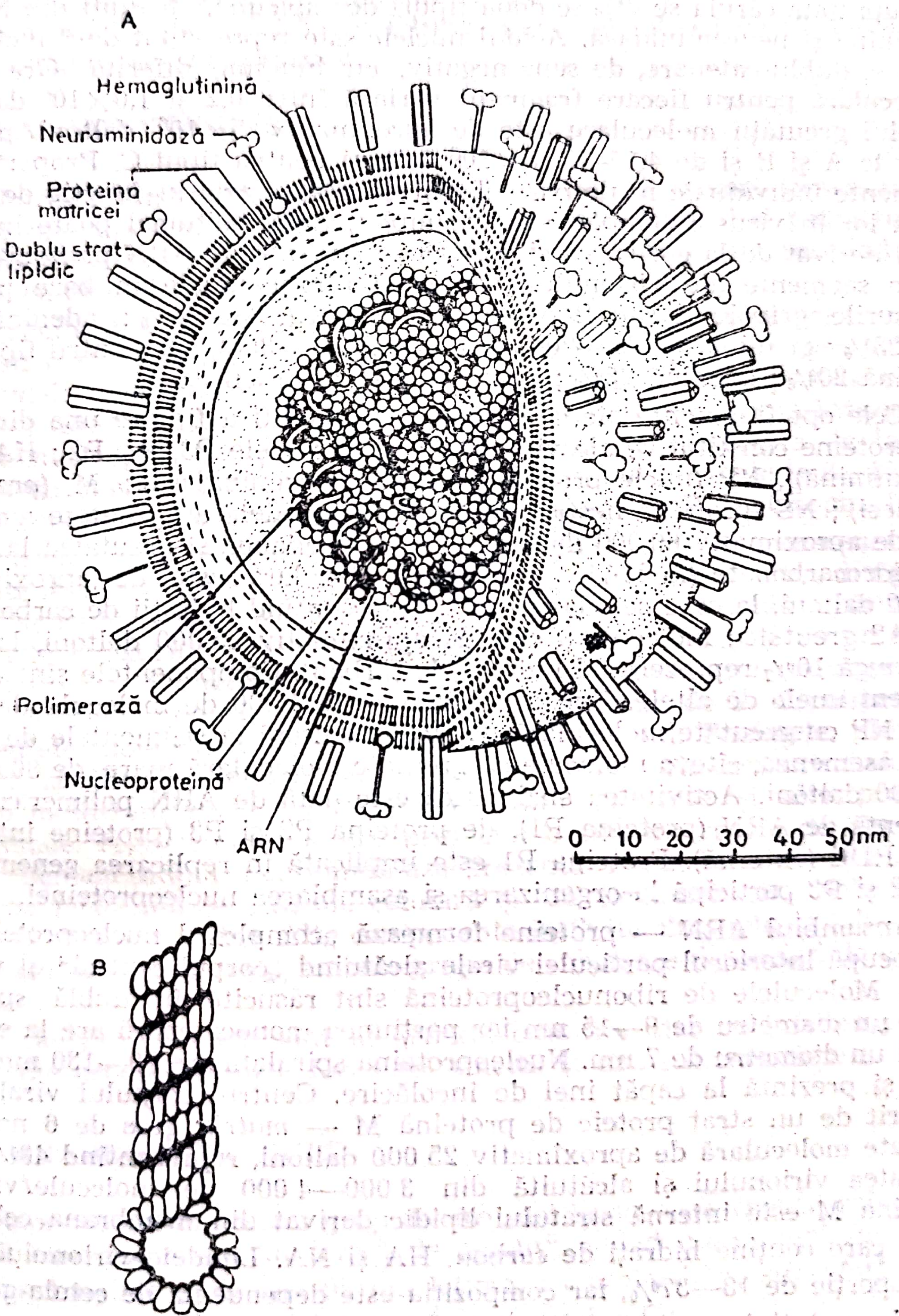

A
Hemaglutinină
Neuraminidază
Proteina matricei
Dublu strat lipidic
Polimerază
Nucleoproteină
ARN
0 10 20 30 40 50nm
B

Fig. 3-6 — Schema structurală a orthomyxovirusurilor *(A)* și a ribonucleoproteinei *(B)* (după Kaplan și Webster, 1979).

pale : hemaglutinina şi neuraminidaza. Aceste virusuri au în general formă sferică, dar în preparatele proaspăt izolate de la bolnavii de gripă se găsesc şi forme filamentoase. Dimensiunile formei sferice variază în raport de tip (A, B, C) între 80—120 nm.

Virionii sînt alcătuiţi din mai multe fragmente de ribonucleoproteină dublu-spiralată, care se găsesc în interiorul unui înveliş extern lipoproteic, pe suprafaţa căruia se găsesc două tipuri de „spiculi“, alcătuiţi din hemaglutinină şi neuraminidază. Acidul nucleic este reprezentat de 8 molecule liniare, dublu-catenare, de sens negativ, cu lungime diferită. Greutatea moleculară pentru fiecare fragment variază între 0,2 şi $1,0 \times 10^6$ daltoni. Totalul greutăţii moleculare este de aproximativ 5×10^6 daltoni pentru tipurile A şi B şi de $4,15—5,15 \times 10^6$ daltoni pentru tipul C. Proporţia de segmente individuale în preparatele virale poate varia în funcţie de existenţa lor în virusul complet sau incomplet. ARN adiţional poate include ARN derivat de la gazdă, ca şi posibile fragmente de ARN provenite din unele segmente ale virionului. Compoziţia procentuală în baze pentru virusurile gripale A sau B este : citozină (C) 23—26% ; adenină (A) 21—23% ; guanină (G) 18—20% ; uracil (U) 31—36%, iar pentru tipul C : citozină 20% ; adenină 23% ; guanină 20% şi uracil 36%.

Cele opt fragmente ale genomului viral codifică fiecare una din cele opt proteine constitutive ale virusului : polimerazele P3, P1, P2 ; HA (hemaglutinină) ; NP (nucleoproteină) ; NA (neuraminidază) ; M (proteina matricei) ; NS (proteină nestructurală). Polipeptidele au greutate moleculară de aproximativ 60 000 daltoni, la care se adaugă şi greutatea lanţurilor hidrocarbonate (la HA1, greutatea moleculară este de aproximativ 35 000 daltoni, la care se adaugă 25% reprezentînd hidraţii de carbon, iar la HA2 greutatea moleculară este de aproximativ 25 000 daltoni, la care se adaugă 10% reprezentînd hidraţii de carbon). Componentele sînt legate covalent unele de altele. Există asociate peste 1 000 de molecule de proteină NP cu greutate moleculară de 60 000 daltoni la segmentele de ARN şi, de asemenea, cîteva molecule cu greutate moleculară mare, de 80 000—100 000 daltoni. Activitatea enzimatică este dată de ARN polimeraza dependentă de ARN (proteina P1), de proteina P2 şi P3 (proteine interne) şi de RDE (externă). Proteina P1 este implicată în replicarea genomului, iar P2 şi P3 participă la organizarea şi asamblarea nucleoproteinei.

Ansamblul ARN — proteine formează „complexul nucleoproteinic“, care ocupă interiorul particulei virale alcătuind „corpul central“ al virionului. Moleculele de ribonucleoproteină sînt răsucite în dublă spirală, avînd un diametru de 9—15 nm iar porţiunea monocatenară are la extremităţi un diametru de 7 nm. Nucleoproteina spiralată are 50—130 nm lungime şi prezintă la capăt inel de încolăcire. Centrul corpului viral este acoperit de un strat proteic de proteină M — *matrix* gros de 6 nm, cu greutate moleculară de aproximativ 25 000 daltoni, reprezentînd 40% din greutatea virionului şi alcătuită din 3 000—4 000 de molecule/virion. Proteina M este internă stratului lipidic derivat din membrana celulei-gazdă care conţine hidraţi de carbon, HA şi NA. Lipidele virionului sînt în proporţie de 18—37%, iar compoziţia este dependentă de celula-gazdă.

Hemaglutinina este reprezentată ca „bastonaşe“. Proteina izolată are formă de prismă, o lungime de 14 nm şi o grosime de 4 nm, cu proiecţii de 8 nm care ies din virion. Numărul unităților de hemaglutinină variază de la tulpină la tulpină, între 500—1 000/virion, și într-un raport față de neuraminidază de cca 5/1. Hemaglutinina este implicată în reacțiile de hemaglutinare, adsorbția virusurilor pe suprafața celulei-gazdă, inițierea ciclului de infecție virală (Schulze, 1975 ; Klenck, 1975) și în procesul de „înmugurire“ a membranei care are loc în perioada de maturare a virionului.

Neuraminidaza este reprezentată de o formațiune alcătuită dintr-un cap de 4 nm lungime și 8,5 nm lățime, atașat la un baston (tulpină) de 10 nm lungime și 4 nm grosime.

3.2.2. PARAMYXOVIRUSURILE

Dintre paramyxovirusurile cu rol în patologia umană, enumerăm : virusul rujeolic, virusul urlian, virusul respirator sincițial și patru tipuri de parainfluenza. Forma acestor virusuri este variată, predominînd cea sferică, cu diametrul între 120—170 nm.

Virionii sînt relativ instabili, pierzîndu-și integritatea structurală. Virionul matur are un înveliș extern de natură lipoproteică, care derivă din lipidele membranei de suprafață a celulei-gazdă. Pe suprafața particulelor virale se găsesc „spiculi“ de natură glicoproteică iar în interior se găsește nucleoproteina (nucleocapsida) helicoidală. Proiecțiile de la suprafața virionului au o lungime de 8 nm, distanțate între ele la 8—10 nm, fiecare conținînd glicoproteine virale (R. W. Compas și P. W. Chopin, 1973).

Nucleocapsida este alcătuită din acid ribonucleic monocatenar, cu greutate moleculară de cca $5—7\times10^6$ daltoni, reprezentînd 0,5% din greutatea particulei virale. Nucleocapsida este liniară, helicoidală, apărînd ca „o panglică răsucită“, cu diametrul extern de 12—17 nm și cu un canal central, gol, cu diametrul de 5 nm. Lungimea nucleocapsidei ajunge pînă la 1 m la unele genuri. Proteinele sînt reprezentate de 5—7 polipeptide, cu greutate moleculară între 35 000—200 000 daltoni. Enzimele, prezente variabil la diferite genuri, sînt : transcriptaza, poliadenilattransferaza, ARNm metiltransferaza, neuraminidaza. Sînt prezente și alte proteine funcționale, reprezentate fiecare prin cîte o singură specie de glicoproteină : hemaglutinina (neuraminidaza prezentă numai la unele virusuri), proteina factorului de fuziune celulară și de hemoliză (H. Nakashima, 1982 ; G. R. Lund, 1984). Alte componente întîlnite sînt lipidele (20—25%) și hidrații de carbon (6%), ambele grupe de substanțe depinzînd de celula-gazdă.

Paramyxovirusurile sînt în general citolitice, dar cu infecție persistentă. Ele produc incluzii, formează sinciții și dau hemadsorbție.

3.2.3. RHABDOVIRUSURILE

Reprezentantul acestui grup de virusuri la om este virusul rabic. Aspectul morfologic este în formă de „glonț“, avînd dimensiuni de 130—180 nm lungime și de 50—95 nm lățime, cu proiecții de suprafață lungi de 5—10 nm și cu diametrul de cca 3 nm (proteina G).

Pe secțiuni ultrafine se observă un canal central axial, care prezintă striații caracteristice (distanțate la 4,5—5 nm). Sînt semnalate particule anormale ca lungime sau de lungime dublă, cît și formațiuni în tandem (fig. 3-7).

Acidul nucleic este alcătuit dintr-o moleculă de ARN liniară, neinfectantă, cu greutate moleculară de $3{,}5—4{,}6 \times 10^6$ daltoni, reprezentînd 1—2% din greutatea virionului.

Nucleocapsida are un diametru de 50 nm, cu simetrie helicoidală și constă dintr-un complex ARN — proteină N (aproximativ 1 700 de molecule cu dimensiuni de $3 \times 5 \times 2{,}5$ nm împreună cu proteinele L și NS). Acest complex este înconjurat de proteina N. Nucleocapsida, care are 28±2 ture din spire mari, egale și 5 ture cu diametrul descrescînd, conține o trans-

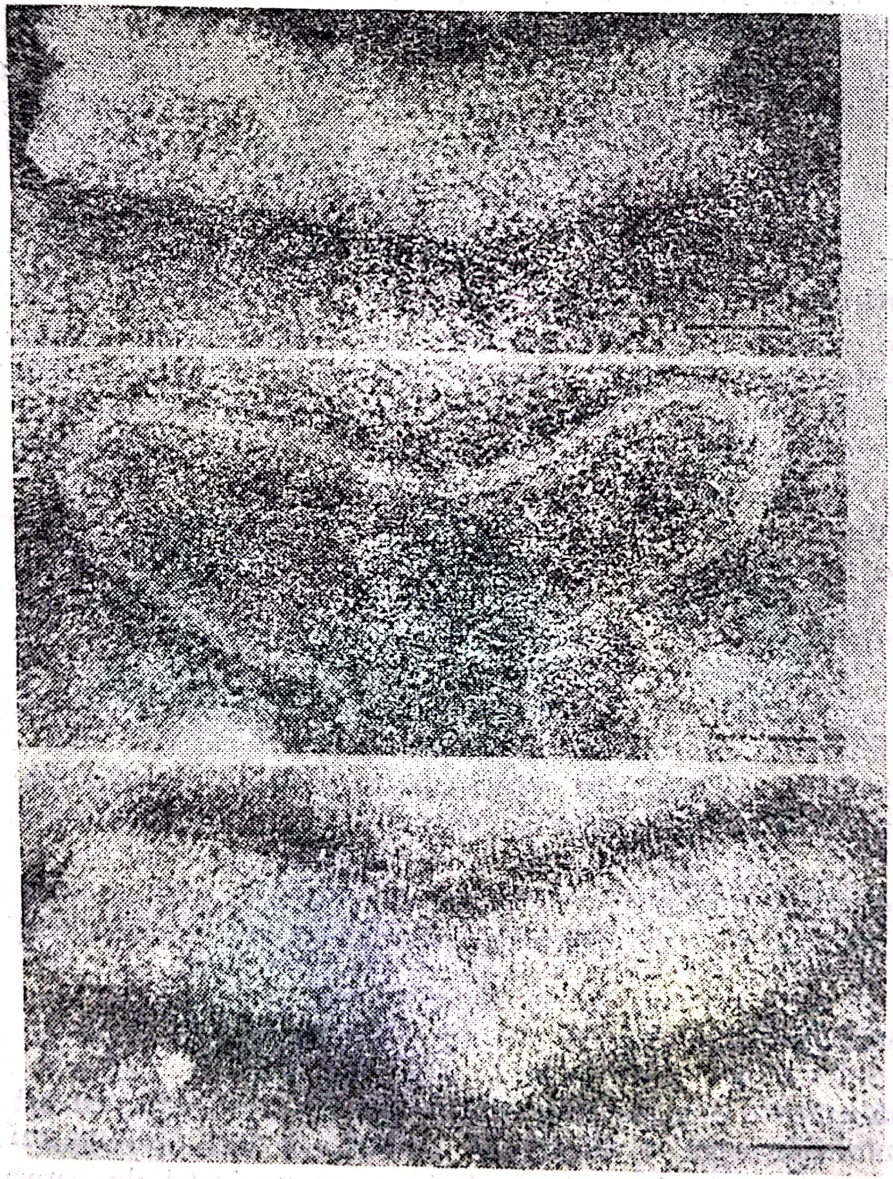


Fig. 3-7 — Polimorfism structural în cazul virusului rabic (50 mm) (după K. Hummeler și N. Tomassini, 1973).

criptază (L+NS) și este infectantă. Ea se dezrăsucește într-o structură helicoidală, de 20×700 nm. Cele 5 proteine pe care le conține virionul sînt : L (190 000 daltoni), G (65 000—80 000 daltoni), N (58 000—62 000 daltoni), M1 = NS (35 000—40 000 daltoni), M2 (22 000—25 000 daltoni) ; numărul subunităților *per* virion este : L —17—150 ; G — 1 600—1 900 ; N — 1 750 ; M1 — 900—950 ; M2 — 1 650—1 700 (Brown și colab., 1979).

Învelișul lipoproteic are o grosime de 7,5—10 nm și conține : fosfolipide, glicolipide, colesterol, glicerofosfolipide, sfingolipide și proteine aparținînd tipurilor de proteine de membrană (M1 și M2). Funcția de a lega nucleocapsida de dublul strat lipidic al învelișului viral o are proteina M2. Moleculele de proteină M1 sînt asociate stratului intern al dublului strat lipidic și se află în mijlocul unor hexagoane, formate din șase molecule de glicoproteine (Hamp și colab., 1984). Suprafața învelișului viral are „spiculi“ aranjați după simetrie hexagonală și inclavați prin bază în dublul strat lipidic. La extremitatea rotunjită a virionului de suprafață se găsesc pentamere.

3.2.4. CORONAVIRUSURILE

Coronavirusurile sînt agenți ai unor enterite. Particulele virale sînt pleiomorfe, anvelopate, cu diametrul mediu de 75—160 nm (fig. 3-8).

Acidul nucleic este format dintr-o moleculă de ARN infectant, cu greutate moleculară între 5,5×10^6 și 6,1×10^6 daltoni. Proteina asociată acidului nucleic are 50 000—60 000 daltoni. Helixul intern are diametrul de 11—13 nm sau „șuvițe“ de 9 nm. Proiecțiile de suprafață trec prin anvelopă, au lungimea 12—24 nm și un buton în capăt. Ele sînt alcătuite din polipeptide cu greutate moleculară mare, glicozilate (S. Siddell și colab., 1981).

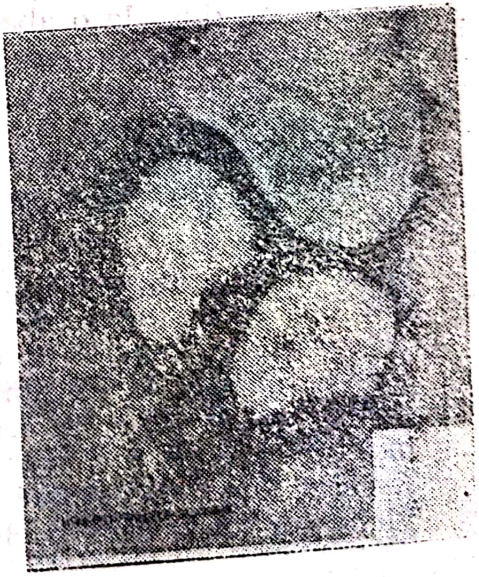


Fig. 3-8 — Coronavirus uman (tulpina 862) (× 144 000) (după A. Z. Kapikian, 1969).

3.3. VIRUSURI CU SIMETRIE ICOSAEDRICĂ

Virusurile descrise ca „sferice“ au fost analizate la microscoape moderne de mărime și rezoluție puternică și s-a putut evidenția astfel că ele au în realitate un contur hexagonal. Unitățile morfologice vizibile la microscopul electronic — capsomerele — nu sînt echivalente cu subunitățile chimice de construcție, ci sînt alcătuite fiecare din cinci sau șase subunități chimice. Astfel, regiunile din jurul fiecărei subunități și legăturile cu vecinele lor nu sînt exact identice, ci aproximativ echivalente sau cvasiechivalente (Caspar și Klug, 1962).

Încă din 1958, cercetările lui Williams și Smith au demonstrat că forma de icosaedru este cea care corespunde structurii unora dintre virusuri. Ulterior, prin diferite lucrări, s-a stabilit că aspectele exterioare ale fețelor externe ale triunghiurilor pot fi convexe sau concave, în diferite grade. Capsomerele sînt așezate practic într-o „cutie“ cu simetria 5 : 3 : 2, dispuse la distanțe radiale egale. Icosaedrul este un poliedru regulat, avînd 20 de fețe, toate triunghiuri echilaterale, 30 de muchii sau creste și 12 vîrfuri (vertexuri). În fiecare vîrf se întîlnesc cinci fețe ale poliedrului, care prezintă astfel cel mai înalt grad de simetrie de tip 5 : 3 : 2, avînd :

a) 6 axe de simetrie rotațională de ordinul 5 reunind cele două vîrfuri opuse ale icosaedrului. Dacă modelul este privit de-a lungul uneia din axe în jurul căreia este rotat, există 5 poziții în care aspectul este identic (o rotație de 2/5 în jurul axului de ordinul 5 face ca figura să coincidă cu ea însăși) ;

b) 10 axe de ordinul 3, reunind centrul a două fețe triunghiulare opuse (o rotație de 2/3 în jurul fiecăreia din aceste axe dă un aspect identic ; deci, privit de-a lungul acestor axe, solidul are un aspect identic în 3 poziții) ;

c) 15 axe de simetrie rotațională de tip 2, reunind mijlocul a două creste (muchii opuse). Privit de-a lungul lor, poliedrul are un aspect identic în 2 poziții (corespunzînd unei rotații de 2/2 în jurul axului).

Triangularea succesivă a fețelor icosaedrului poate mări numărul unităților de construcție și, în consecință mărește dimensiunile virusului. Aceasta nu duce la o abatere de la principiul cvasiechivalenței, deși pentonii suferă o deformare mai mare în spațiu pentru a asigura poziția lor în vîrfurile icosaedrului. Capsomerele formate din 5 unități de structură (*pentamere* sau *pentoni*) sînt așezate în fiecare vîrf al icosaedrului, iar capsomerele formate din 6 unități de structură (*hexamere* sau *hexoni*) — pe muchiile și fețele icosaedrului.

Pentru calcularea numărului capsomerelor virusurilor icosaedrice, Horne (1962) propune o formulă în care numărul total al capsomerelor (N) este dat de formula : $N = 10(n-1)^2+2$ (în care n este numărul total al capsomerelor vizibile pe o creastă a icosaedrului, inclusiv cele două capsomere situate la extremități, la vîrfurile care limitează creasta). Dacă $n = 2$, atunci $N = 32$, ceea ce se întîlnește în structura virusului poliomielitic care are o capsomeră la fiecare vîrf (12) și o capsomeră în centrul fiecărei fețe (20). Atunci cînd unitățile de structură sînt așezate în jurul vîrfurilor icosaedrului, ele formează 12 grupuri de cîte 5 subunități, care corespund unui virus izometric foarte simplu, alcătuit din 60 de unități de structură.

Din modul de aranjare a unităților structurale chimice (cele mai mici unități structurale funcțional echivalente ale capsidei și care pot fi un singur lanț polipeptidic ori un agregat de lanțuri, identice sau diferite) rezultă structurile vizibile la microscopul electronic, unități morfologice sau capsomere. care la rîndul lor se grupează ordonat prin legături necovalente, pentru a constitui capsida. Așa cum am mai arătat, aranjamentul capsomerelor în capside icosaedrice este supus regulilor cristalografice pentru corpurile cu 12 vîrfuri și 20 de fețe. Unitățile structurale (capsomerele) de pe muchii și fețe se învecinează cu 6 capsomere și au 6 laturi (hexamere sau hexoni), cele din jurul vîrfurilor se învecinează cu 5 capsomere și au 5 laturi (pentamere sau pentoni). Numărul pentonilor este invariabil, iar al hexonilor este diferit, în raport de mărimea lui *n* și respectiv a virionilor. De asemenea, fețele triunghiulare ale icosaedrului pot fi subîmpărțite în triunghiuri și mai mici, solidul devenind un „icosaedeltaedron“, asemănător cu domul din arhitectură („domul geodezic“ al lui Fuller, format din pentamere și hexamere). Pentru virusurile icosaedrice, relația genomului cu capsida capătă particularități în raportul spațial. Astfel, genomul viral sau în asociere cu una sau mai multe proteine bazice formează porțiunea centrală a nucleocapsidei cvasisferice.

Aranjamentul este diferit, astfel : pentru herpesvirusuri, genomul ADN este răsucit pe un mănunchi de fibre de proteine fibrilare (structură toroidală), iar pentru reovirusuri, capsida este formată din două straturi de capsomere pentru ARN dublu-spiralat. Pentru a se putea respecta organizarea riguros geometrică a virusurilor cu simetrie icosaedrică este necesar să existe o interacțiune puternică între proteinele capsidale și genomul viral (Lonberg și Holm, 1974).

Virusurile cu simetrie icosaedrică întîlnite la om se pot grupa după structură și compoziție chimică ; dintre ele vom ilustra ca virusuri ce conțin ARN picorna- și reovirusurile, iar dintre virusurile ce conțin ADN, grupul adenovirusurilor (fără peplos) și grupul herpesvirusurilor (cu peplos).

3.3.1. PICORNAVIRUSURILE

În grupul picornavirusurilor care dau boli la om intră enterovirusurile și rhinovirusurile. Ca enterovirusuri umane semnalăm : virusurile poliomielitice umane 1, 2, 3 ; virusurile Coxsackie A1-22, 24, Coxsackie B1-6 ; virusurile ECHO 1-9, 11-27, 29-34 ; virusurile umane enterice 68, 71, 72, iar dintre rhinovirusuri : virusul guturaiului, rhinovirusul uman 1A și rhinovirusurile 2-113.

Particulele virale sînt nucleocapside dezvelite (nude), sferice, aspre, cu diametrul de 22—30 nm (P. D. Cooper, E. Arnold, 1984). Sînt virusuri icosaedrice, cu $T = 1$, nu prezintă anvelopă sau miez și nu au proiecții pe suprafață, care se prezintă fățuită. Capsida constă din 60 de subunități, fiecare conținînd o moleculă din cele 4 polipeptide majore care se formează din clivarea unei molecule de proteină structurală precursoare (80 000—100 000 daltoni). Unele subunități pot fi incomplet despărțite.

Din cele 4 polipeptide, 3 au greutatea moleculară cuprinsă între 24 000—41 000 daltoni, iar una — între 55 000—135 000 daltoni.

Acidul nucleic este o moleculă de ARN de sens pozitiv, cu greutate moleculară de $2,5 \times 10^6$ daltoni, care este infectant. O secvență poliadenilică este trancrisă pe 3'-terminal și mai există o proteină VPg (2 400 daltoni) legată covalent la capătul 5'-terminal (P. Ahlquist, P. Kaesberg, 1979). Virionii nu conțin hidrați de carbon și lipide. În general, particulele virale nu sînt distruse de detergenți neutri, dar unele specii au o sensibilitate la pH sub 6.

3.3.2. REOVIRUSURILE

Reovirusurile întîlnite la om sînt reovirusul tip 1 și rotavirusurile. Reovirusul are particula virală de 76 nm și un miez de 52 nm, ce conține în jur de 45% ARN. ARN este alcătuit din 10 molecule de ARN dublu-catenar răsucit, cu greutate moleculară de $0,5—2,7 \times 10^6$, care reprezintă 14% din greutatea virionului, și cu o compoziție în baze de 42—44% G+C. Virionul conține în jur de 3 000 de molecule dublu-spiralate de oligonucleotide, din care 2—20 de nucleotide lungi. Nu se constată secvențe omoloage între membrii genului reovirusurilor și membrii altor genuri (S. C. Silverstein și colab., 1966). Cele 9 polipeptide reprezintă 86% din greutatea virionului și au greutatea moleculară cuprinsă între 34 000—55 000 daltoni. Pe lîngă transcriptaza care necesită enzime proteolitice pentru activare, virusul conține și alte enzime, de asemenea și fosfohidrolaznucleotida. Dintre cele două membrane cu care este prevăzut virusul, una acoperă nucleocapsida, iar cealaltă suprafața externă.

Virionii rotavirusurilor au structură icosaedrică (cu $P = 3$, $T = 3$), au diametrul de 65—75 nm și capsomerele alcătuite din subunități. Capsida are 12 pentamere și 120 de hexamere, unitățile structurale fiind în număr de 780 (Khaustov, 1984). ARN este de tipul dublu-catenar, răsucit, alcătuit din 11 piese cu masă moleculară de $0,2—2,2 \times 10^6$ daltoni. Polipeptidele, în număr de 8—10, au masa moleculară cuprinsă între 15 000 și 130 000 daltoni (T. H. Flewett și G. N. Woode, 1978). Virionii sînt rezistenți la eter, relativ stabili la căldură și infectivitatea este stabilă la pH 3.

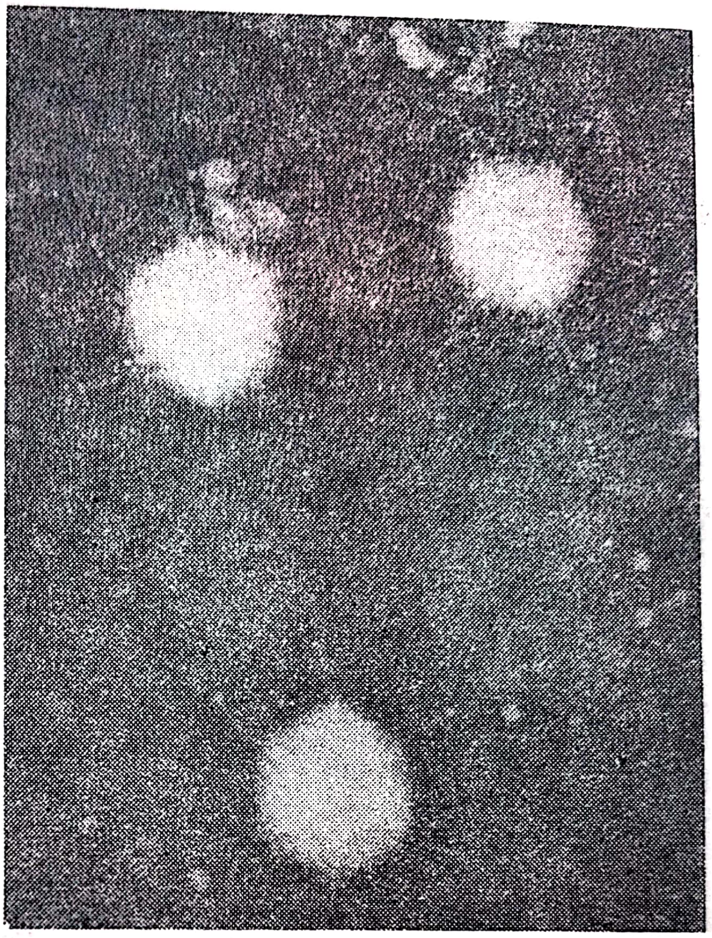
3.3.3. ADENOVIRUSURILE

Cercetări independente, ale lui Rowe și colab. (1953) și ale lui Hilleman și Werner (1954) au pus în evidență în culturile de celule de țesut amigdalian prezența adenovirusurilor.

Cercetările de microscopie electronică făcute de diferiți autori au adus date importante privind structura acestor virusuri (fig. 3-9).

Morfologia virionului prezintă o moleculă de ADN dublu-catenar, lungă de 12 nm, care este împachetată într-o capsidă icosaedrică, cu diametrul de 60—80 nm, compusă din 252 de capsomere. La cele 12 vîrfuri ale icosaedrului, se găsesc capsomere pentamerice — pentoni — care

Fig. 3-9 — Adenovirus tip 5 (× 200 000) (după R. C. Valentine și H. C. Pereira, 1965).



au o structură complexă. Ele sînt formate din două subunități legate necovalent : una se găsește la baza pentonului, inclavată în capsidă ; de ea este legată o prelungire fină, filamentoasă, fibra groasă de 2 nm și cu o lungime de 10—30 nm (variabilă în raport de serotip), care se termină cu un buton cu diametrul de 4 nm și care conține și hidrați de carbon. Restul de 240 de capsomere sînt reprezentate de hexoni. Ele au formă elipsoidală (9,5×11 nm), cu o porțiune goală, centrală, cu diametrul de 2,5 nm. Capsida are un corp central („*core*") — nucleoid — care conține ADN viral dublu-catenar, asociat cu proteine interne (două proteine necapsidale și poliamine, care diminuă sarcina negativă și astfel au rolul de a-l menține în stare condensată). ADN din genom este o moleculă dublu-catenară, liniară, cu greutate moleculară de $20—25\times10^6$ daltoni, conține G+C în proporție de 48—61% și reprezintă 10—12% din greutatea virionului (aproximativ 35 000 de perechi de baze). Acidul nucleic este infectant și are capacitate transformantă, variabilă de la un tip de virus la altul (R. W. M. Ruigrok și colab., 1984). Adenovirusurile au 10—12 polipeptide, diferite, cu greutate moleculară cuprinsă între 50 000—120 000 daltoni. Ele intră în structura hexonilor (proteina II), a bazei pentonilor (proteina III), a fibrelor (proteina IV) sau ca proteine interhexonale sau asociate hexonilor (proteinele VI, VIII, IX) ; proteinele V și VII sînt „interne", fiind asociate ADN, celelalte proteine avînd o localizare şi un rol încă necunoscut (Brown şi colab., 1975 ; Morin şi colab., 1984).

Antigenele de suprafaţă ale virionului conţin elemente specifice speciei gazdei (hexone pentru neutralizare, fibre pentru hemaglutinoinhibare). Antigenul solubil este un produs al proteinelor capsidei. Hexonul liber reacţionează ca antigen specific de gen, care se găseşte în majoritatea tulpinilor M (mamalian) şi diferă de cel din tulpinile A (avian). Hexonii şi alte antigene solubile poartă determinanţi specifici de gen, subgrup sau de specie.

Adenovirusurile umane (H) persistă în cavitatea bucofaringiană şi pot produce : faringite, bronhopneumonii, enterite, conjunctivite şi, totodată, au capacitatea de a transforma malign celulele gazdei (Schlesinger, 1969).

3.3.4. VIRUSURILE HERPETICE

Din acest grup semnalăm la om patru reprezentanţi : virusul herpes simplex, cu două subtipuri 1 şi 2, virusul citomegalic, virusul Epstein-Barr şi virusul varicelei (varicella-zoster).

Virusul herpes simplex tip 1 (fig. 3-10) dă în general infecţii latente, persistente sau manifeste, ca herpes labial, gingivostomatite, keratite, encefalite, iar subtipul 2 dă în general manifestări urogenitale, fără a fi o

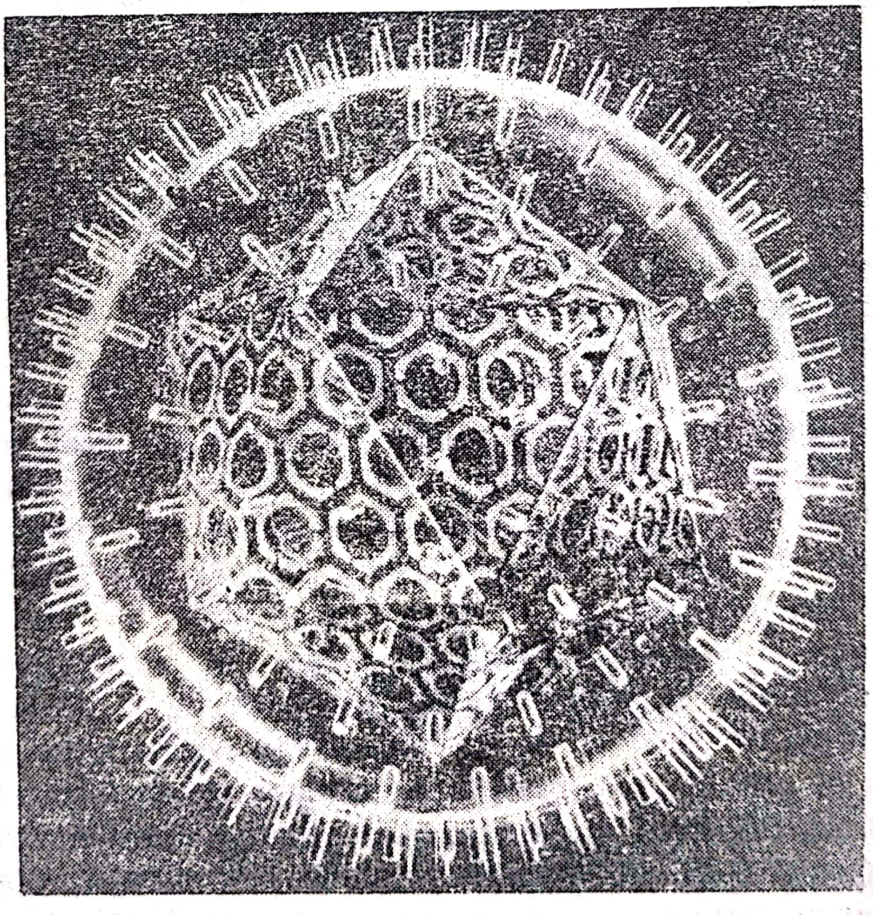


Fig. 3-10 — Modelul structural al virusului herpes simplex (G. D. W. McKendrick şi S. Sutherland, 1983).

delimitare netă, atît unul cît și celălalt tip de virus găsindu-se în ambele grupe de manifestări clinice.

Virusul citomegalic dă în special infecții persistente și malformații la făt.

Virusul Epstein-Barr produce mononucleoză infecțioasă și este asociat cu neoplasmele de col uterin în Europa și America de Nord, iar în Africa produce la copii limfom Burkitt.

Virusul varicelei produce varicelă, care este o boală eruptivă.

Virionii sînt alcătuiți din 4 componente structurale. Miezul („*core*") constă dintr-o moleculă de ADN dublu-catenar, liniar (de 44 μm pentru virusul herpes simplex 1). Greutatea moleculară și compoziția în baze sînt : 96×10^6 daltoni și 67% G+C pentru virusul citomegalic, 92×10^6 daltoni și 72% G+C pentru virusul varicelic și de 110×10^6 daltoni pentru virusul Epstein-Barr. Secvențele repetitive terminale sînt la ambele capete în formă inversă internă pentru virusurile herpes simplex și citomegalic, numai la un capăt pentru virusul varicelic, iar pentru virusul Epstein-Barr — la ambele capete secvențe terminale inverse, nu intern repetate. O altă caracteristică a ADN al acestor virusuri este că se găsesc în mai multe forme izomerice : astfel, virusul herpes simplex 1 se găsește în 4 forme izomerice, iar 50% din secvențe sînt în condiții de hibridizare cu virusul herpes simplex de tip 2 (B. Roizman, 1979). Genomul codifică un număr destul de mare de polipeptide : 47—49 pînă la 100 (Holmes, 1974 ; Watson, 1976), din care numai o parte sînt proteine structurale (cam jumătate).

Înfășurarea ADN este făcută ca o bobină, al cărei centru are un diametru intern de 18 nm și unul extern de 70 nm. Distanțele dintre spirele înfășurării ADN sînt de 4—5 nm. Forma generală a acestei înfășurări este ca a unui mosor (formă toroidală). Capetele genomului se găsesc pe fața internă a nucleocapsidei, genomul formînd nucleoidul.

Capsida este icosaedrică, cu diametrul de 100—110 nm, are 162 de capsomere de forma unor prisme, cu dimensiuni de 5—12,5 nm, care au un canal central gol, cu diametrul de 4 nm, ce se întinde doar pe jumătate din lungimea prismei. Capsomerele sînt în număr de 12, la vîrfuri avînd forma de pentamere (pentoni) și în număr de 150 pe suprafețe și muchii, avînd forma de hexamere (hexoni).

Proteinele structurale au o greutate moleculară ce variază între 12 000 —22 000 daltoni. Capsida este învelită de două straturi : unul, imediat peste capsidă, constă din materialul globular, alcătuit din glicoproteine legate covalent cu zaharuri aminate ; acest strat este frecvent asimetric distribuit și în cantități variabile ; celălalt strat, extern, este un dublu strat lipidic, ce conține și unele proteine de natură virală care alcătuiesc proiecții de suprafață. Anvelopa intactă este impermeabilă colorației negative. Virionii ating, cu toate componentele, dimensiuni cu diametrul de 180—200 nm. În anvelopa virală se găsește o glicoproteină ce reacționează cu anticorpii neutralizanți și, totodată, în anvelopă sînt prezenți și receptorii fixatori de complement (L. Pereira și colab., 1976).

3.4. VIRUSURI CU ORGANIZARE COMPLEXĂ

3.4.1. POXVIRUSURILE

Dintre poxvirusuri la om semnalăm virusul variolei, virusul vaccinal, virusul moluscului contagios şi virusul nodulilor lăptarilor.

Morfologia lor este în general asemănătoare. Virionii au formă de cărămidă (primii trei) sau ovoidală, ca cei ai virusurilor nodulilor lăptarilor. Dimensiunile particulelor sînt de 300—450 nm/170—260 nm (virusul vaccinal are dimensiunea $220 \times 220 \times 260$ nm).

Virionii sînt alcătuiţi din proteine, ADN şi lipide (fosfolipide, colesterol, grăsimi neutre) şi hidraţi de carbon (fig. 3-11).

Pe secţiuni ultrafine, virionii se prezintă ca avînd o parte centrală alungită (ca un disc oval biconcav, cu aspect de halteră), numită nucleoid şi care este purtătorul ADN. Pe părţile laterale se găsesc nişte formaţiuni ovoide, numite corpi laterali. Nucleoidul şi corpii laterali sînt înveliţi de o membrană de suprafaţă cu structură striată. Suprafaţa nucleoidului este acoperită cu o membrană internă, groasă de cca 5 nm, şi un strat extern, alcătuit din subunităţi cilindrice, scurte, aranjate regulat, ce au o lungime de 10 nm şi diametrul de 5 nm. Corpul central al nucleoidului este purtătorul genomului viral, care are o moleculă de ADN dublu-catenar, liniară, cu capetele terminale covalent închise. Lungimea acesteia, de 87—100 μm, este citată de Joklik, în 1974, ca fiind cea mai lungă. Greutatea moleculară a ADN variază pentru reprezentanţii grupului între 85—240 $\times 10^6$ daltoni (virusul vaccinal are ADN de 160×10^6 daltoni, iar ADN al virusului nodulilor lăptarilor, de 85×10^6). Compoziţia în baze G+C este cuprinsă între 35—40%. Nu se cunoaşte modul cum este aşezat în nucleoid ADN viral, ale cărui dimensiuni depăşesc volumul ocupat de genom în forma sa condensată. Nu se cunoaşte compoziţia chimică şi funcţia corpilor laterali.

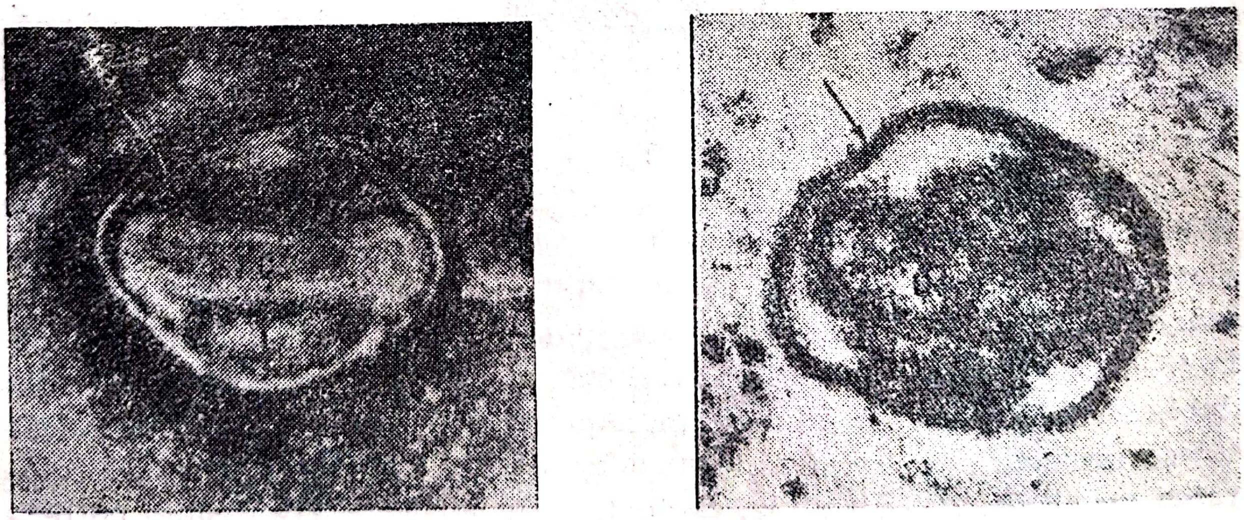


Fig. 3-11 — Poxvirusuri.
a — particulă virală colorată negativ (*C* — *core* ; *L* — corpi laterali (× 120 000) ; *b* — virus vaccinal — secţiune ultrafină (× 120 000) (după S. Dales şi L. Siminovich, 1961).

Genomul codifică cîteva sute de proteine, dar se cunosc numai cca 30 de proteine structurale (Woodson, 1968). Greutatea moleculară a proteinelor structurale este cuprinsă între 30 000—100 000 daltoni. Ele se găsesc fie în corpul central, fie la suprafață. Sînt proteine enzimatice, care contribuie la sinteza și prelucrarea acidului nucleic, incluzînd și o ADN transcriptază, proteinkinaze etc.

Membrana externă a virusului conține lipide și structuri proteice globulare sau tubulare. Subunitățile globulare au diametrul de 5 nm, iar subunitățile tubulare au diametrul de 5 nm și lungimea de 10 nm. Aranjamentul lor pe suprafața virusului poate să dea formațiuni variabile ca lungime, cuprinse între 70—100 nm (U. Krempiem și colab., 1981). La virionii nodulilor lăptarilor, aceste formațiuni se înfășoară ca un singur fir pe întreaga suprafață a virionilor.

3.4.2. RETROVIRUSURILE

Retrovirusurile constituie un grup de virusuri complexe ce au în structura lor ARN și o enzimă, reverstranscriptaza, care permite, pornind de la ARN, replicarea ADN. Virusurile din acest grup ce se întîlnesc la om aparțin subfamiliilor : *oncoviridae* și *lentiviridae*.

Particulele virale de formă sferică au dimensiuni de 1 000 Å, fiind alcătuite dintr-un nucleoid central, cilindric, și o anvelopă compusă din strat lipidic și glicoproteine. Variabilitatea structurală, antigenică, a anvelopei este deosebit de mare.

ARN are 9 193 de nucleotide și este situat în nucleoid împreună cu unități de reverstranscriptază. În secvențele repetitive terminale se găsesc 3 gene : gena *gag*, ce determină sinteza proteinelor nucleoidului — gp55, clivată în P18 și P24 ; gena *pol*, sinteza reverstranscriptazei ; gena *env*, sinteza glicoproteinei 160, ce se clivează în gp120 și 41 din anvelopă.

Genomul viral mai conține și genele *tat* ce codifică o proteină implicată în amplificarea transcripției și translației genelor *env* și *gag*, dependentă de gena *art/trs ;* gena *art/trs,* ce codifică o proteină cu rol de control în amplificarea expresiei genelor *env* și *gag ;* gena *sor,* ce codifică o proteină cu rol probabil în infectivitate ; gena 3 *orf,* ce codifică o proteină cu rol potențial de supresie a replicării virale ; gena *R,* ce codifică o proteină cu rol încă necunoscut.

Bibliografie selectivă

DALTON A. J., HAUGENAU F. — Ultrastructure of Animal Viruses and Bacteriofages : An atlas — Ultrastructure in Biological Sistems, vol. V, Academic Press Inc., New York — Londra, 1973.

DUCA E., DUCA M., FURTUNESCU G. — Microbiologie medicală, Edit. Didactică și Pedagogică, București, 1979.

KILBOURNE E. D. — The Influenza Viruses and Influenza, Academic Press Inc., New York, 1975.

MATHEWS R. E. F. — Classification and Nomenclature of Viruses, Fourth Report of International Committee on Taxonomy of Viruses, Department of Cell Biology, University of Auckland, New Zeeland, 1982.

ZARNEA G. — Tratat de microbiologie generală, vol. I, Edit. Academiei R. S. România, București, 1983.

BARRY C. H., MAHY D. — Negative Strand Virus, Academic Press Inc., Londra — New York — San Francisco, 1978.

4

Acţiunea agenţilor fizici, chimici şi biologici asupra virusurilor şi replicării virale

4.1. INTRODUCERE

Încă înainte de descoperirea primelor virusuri (Ivanovski, 1892 ; Löffler şi Frosch, 1897) au fost utilizate metode de atenuare a germenilor cu ajutorul unor agenţi fizici în profilaxia virală (Pasteur, 1885).

Epoca marilor descoperiri pe tărîmul virusologiei a marcat în deceniile următoare achiziţii de o covîrşitoare importanţă aplicativă, care, departe de a fi depăşite, în zilele noastre au devenit metode clasice de conservare, ori dimpotrivă, de atenuare sau inactivare a virusurilor. Astfel, în 1887, Roux a folosit glicerina ca factor care permite conservarea virulenţei virusurilor ; în 1903 Van Steenberghe a introdus liofilizarea în virusologie ; în 1906 Claudio Fermi, cu ajutorul fenolului, şi în 1914 Cumming, cu ajutorul formolului, au atenuat capacitatea infectantă virală, iar în 1922 Levaditi, Harvier şi Nicolau au folosit, în asociaţie cu lumina, acţiunea virulicidă a unor coloranţi. În România, Duca şi colab. (1954) au inactivat şi transformat, cu ajutorul apei ionizate, virusul rabic fix în vaccin antirabic ; Nicolau şi colab. (1959) au obţinut un vaccin antirabic prin atenuarea virusului cu ioni de argint (Ag^+) ; Cajal şi colab. (1964) au exacerbat capacitatea hemaglutinantă a virusului vaccinal cu ajutorul radiaţiilor X ; între 1964 şi 1965 Cajal şi Burducea au inactivat o serie de virusuri prin iradiere gamma, iar, mai recent, în 1982 Cajal şi colab. au precizat efectele radiaţiilor cosmice şi ale ionilor grei asupra unor antigene virale în condiţiile zborului spaţial, lucrări ce reprezintă adevărate cercetări de pionierat în virusologie.

Entităţi unice fizice şi chimice, particulele virale sînt constituite dintr-un acid nucleic — în care rezidă informaţia genetică şi capacitatea infectantă — inclus într-un înveliş protector, conţinînd proteine şi eventual lipide. Factorii inactivanţi ai virusurilor se adresează acestor structuri ale corpusculilor virali şi, din acest punct de vedere, se grupează în patru categorii distincte :

— agenţi nucleotropici : radiaţiile ultraviolete cu lungimea de undă de 260 nm, formaldehida, acidul nitros, hidroxilamina, elementele radioactive dezintegrante încorporate în acidul nucleic (cum este ^{32}P în virusurile fără fosfolipide sau ^{3}H încorporat ca timidină în ADN) ;

— agenţi proteotropici : radiaţiile ultraviolete cu lungimea de undă de 235 nm, enzimele proteolitice, acizii slabi, compuşii conţinînd sulfhidril sau sulfhidril-reactivi ;

— agenţi lipotropici : solvenţi ai lichidelor, enzime lipolitice ;
— agenţi universali : radiaţiile X, agenţii alkilanţi, fotodinamismul.

O a doua grupă este formată din agenţi care previn adsorbţia şi penetrarea virusurilor în celulă, precum şi inhibitorii replicării virale intracelulare.

4.2. ACŢIUNEA AGENŢILOR FIZICI, CHIMICI ŞI BIOLOGICI ASUPRA VIRUSURILOR

4.2.1. AGENŢII FIZICI

Încă de la apariţie, virusurile au fost supuse permanent acţiunii favorizante sau, dimpotrivă, nocive a factorilor fizici din natură (căldură, lumină, radiaţii), dar aplicarea conştientă a acestora ca mijloc de luptă împotriva lor s-a făcut foarte tîrziu.

Uşor de manevrat, condiţionaţi de permanenta modernizare a aparaturii şi funcţie de intensitatea şi durata acţiunii lor, agenţii fizici sînt utilizaţi astăzi la distrugerea ori la conservarea virusurilor sau, în sfîrşit, la modificarea caracterelor lor, în vederea transformării în virusuri-vaccin.

4.2.1.1. *Temperatura*

Conform teoriei cineticii moleculare, temperatura este nivelul termic, fondul energetic dat de suma energiilor potenţiale şi cinetice ale moleculelor care se mişcă dezordonat în jurul poziţiei lor de echilibru, ce dă naştere la radiaţii calorice propagate prin unde cu lungimea (λ) de 7 600—4 000 000 Å.

Temperatura mediului ambiant (a camerei, laboratorului, 18—25°C). Influenţează diferit capacitatea de rezistenţă a diferitelor virusuri ; astfel, agentul etiologic al mononucleozei infecţioase rezistă 24 de ore la temperatura de 18°C, virusul aftos — între 5 şi 18 zile (Galloway, 1932), 14 zile — adenovirusurile (Ginsberg, 1962), 70 de zile — virusul Coxsackie, 2—3 luni — virusul pestos porcin (Gheorghiu şi colab., 1966), 6—8 luni — virusul urlian, 10—12 luni — virusul rabic fix, 18 luni — virusurile variolei şi al encefalitei de St. Louis şi 32 de luni — virusul Aujeszky (Stamatin, 1965).

Căldura (radiaţiile calorice sau termice). Reprezentînd, ca şi lucrul mecanic, un mod de transmitere al energiei, căldura se propagă în mediul material în trei moduri elementare : prin conducţie, convecţie şi prin radiaţie. Elementul comun celor trei forme menţionate este mişcarea continuă a particulelor formînd materia, iar mecanismul intim al fenomenelor depinde de starea de agregare a acesteia (solidă sau lichidă), de natura şi specificul substanţei, ca şi de mişcarea relativă a straturilor de material. Funcţie de mediul pe care îl traversează, radiaţiile calorice sînt absorbite diferit, puterea de absorbţie mărindu-se prin creşterea cantităţii de umiditate din sistem (Stamatescu şi colab., 1979).

Din spectrul total al radiaţiilor, numai cele cu lungimea de undă cuprinsă între 0,76 şi 400 µm produc în mod pregnant un efect termic. Chiar şi un corp mai rece radiază căldură către unul cu temperatură mai ridicată, dar fluxul emis este mai mic decît cel primit de corpul mai cald.

Radiaţiile termice sînt în general invizibile, dar sînt perceptibile tactil, sub formă de căldură ; cînd, însă, aceste radiaţii depăşesc nivelul de 700—800° Kelvin*, atunci devin vizibile cu ochiul liber.

Termostatarea (incubarea la 37°C). Termostatarea suprimă puterea patogenă a virusului herpes simplex în 2—40 de ore (Löwenstein, 1920), a virusurilor rujeolic şi ECHO — în 48 de ore (Orfila, 1971), a arbovirusului West Nile — în 72 de ore, a virusului febrei aftoase — în cîteva zile, a adenovirusurilor — în 7 zile şi a virusului pestei porcine — în 18—20 de zile (Gheorghiu şi colab., 1967).

Inactivarea la 56°C afectează majoritatea virusurilor, în timp relativ scurt ; astfel, foarte rapid, în 5 min sînt inactivate virusul gripal şi rickettsia tifosului murin, în 10 min — arbovirusurile Denga, în 15 min virusurile Coxsackie şi aftos, în 20 min — virusurile urlian şi al miocarditei Columbia SK, în 30 min — virusurile polio, herpetice, al guturaiului, encefalitei japoneze B şi arbovirusul Sindbis. Arbovirusul West Nile într-o oră îşi pierde numai jumătate din capacitatea sa patogenă, iar virusul pestei porcine, mai rezistent, este inactivat complet abia în 24 de ore la această temperatură.

Căldura între 60—100°C distruge rapid şi în mod progresiv marea majoritate a virusurilor ; Burbury arată că rapiditatea de distrugere a virusului aftos creşte în mod spectaculos în proporţie de 1,7 pentru fiecare grad Celsius. Astfel, o cantitate de virus care ar fi distrusă în 100 min la 50°C, ar fi distrusă în 50 s la 60°C şi în numai o milionime de secundă la 100°C. De la 60°C în sus, deci, distrugerea sa este atît de rapidă, încît în mod practic nu mai este posibilă evaluarea timpului. La *60°C* sînt distruse virusurile : aftos în 50 s, rabic în 5 min, amaril în 10 min, rujeolic în 30 min, iar al pestei porcine în 10 ore, dar numai într-o oră la *70°C*. La *80°C* arbovirusul Louping-Ill este distrus în 30 s, pe cînd virusurile neconvenţionale (Kuru, Creutzfeldt-Jakob şi Scrapie) sînt incomplet inactivate la această temperatură.

Fierberea la 100°C. Prin fierbere la 100°C virusul aftos şi rickettsiile sînt distruse instantaneu, virusul rabic — în 2 min, al hepatiei A — în 5 min, iar virusul hepatitei B — în 30 min.

Prin *încălzire la 107°C*, virusul herpetic îşi pierde complet proprietatea sa encefalitogenă abia într-o oră şi jumătate (Kopeloff şi Holden, 1932).

---

* În urma Conferinţei Generale de Măsuri şi Greutăţi (Paris, 1967), simbolul temperaturii pe scara Kelvin este „K", iar relaţia de transformare din grade Celsius în grade Kelvin este :

$$T\ (^\circ K) = 273{,}15 + t\ (^\circ C)$$

Temperatura de —273,15°C (egală cu zero grade Kelvin sau 0°K) reprezintă temperatura minimă, denumită „zero absolut".

Autoclavarea, fenomen descoperit și studiat încă din secolul al XVII-lea de Papin prin fierberea apei într-un spațiu ermetic închis și formarea de vapori de apă supraîncălziți sub presiune, asigură temperaturi mai înalte de 100°C; astfel, la o presiune de 2 atm temperatura de fierbere a apei este de 121°C, la 3 atm de 134°C, la 4 atm de 144°C, la 5 atm de 152°C. Căldura umedă, astfel obținută, distruge microorganismele patogene și sporii lor — care rezistă pînă la 120°C. În *cuptorul Pasteur* (pupinel) se obține sterilizarea uscată la temperaturi de peste 120°C. Prin autoclavare la 105°C sau în cuptorul Pasteur, la temperatura uscată de 180°C, virusul hepatitei A este distrus în scurt timp, pe cînd virusul hepatitei B — în 30—60 min.

Frigul. Treaptă coborîtă a nivelului termic — exprimată prin încetinirea mișcării moleculare — frigul se realizează în instalații frigorifice pe principiul absorbției căldurii dintr-un spațiu închis, prin evaporarea unui gaz în stare lichidă (amoniac, freon etc.) și retransformarea sa în lichid, prin compresiune.

Frigul are acțiune conservantă asupra virusurilor, temperaturile negative fiind larg utilizate la stocarea îndelungată a materialelor patogene.

Frigul moderat (refrigerarea, 4—8°C). Virusurile se conservă mai bine la temperatura frigiderului comparativ cu temperatura mediului ambiant; dacă, în general, chlamydiile sînt puțin rezistente la frig (spre exemplu, *Chlamydia psittaci* rezistă numai 8 zile cînd este păstrată la gheţar), virusul rujeolic își păstrează infectivitatea 5—6 luni, virusul aftos din limfa virulentă de la cobai rămîne infectant pînă la 190 de zile, virusul pestos porcin din serul sanguin este încă virulent după 120 de zile (Geiger, 1937) iar în sîngele defibrinat — 162 de zile (Hoskins, 1942) sau chiar 398 de zile (Gheorghiu și colab., 1966), virusul rabic fix rămîne virulent cel puțin 732 de zile (Lépine, 1931), poliovirusul — 792 de zile în fragmente de nevrax de maimuță (Vieuchange și Descola, 1947), virusul bolii Newcastle în lichidele organice — pînă la 18 luni, iar limfa variolică își menține activitatea patogenică timp de 2—3 ani (Gheorghiu și colab., 1966).

Temperaturile joase (congelarea) respectă, în general, integritatea fizică și funcțională a corpusculului viral fără pierderi importante în domeniul infectivității și antigenicității, fiind astfel cel mai uzual mijloc de păstrare îndelungată a virusurilor și produselor patologice; fac excepție virusurile hemaglutinante din lichidele embrionare, care își diminuează substanțial titrul hemaglutinant, motiv pentru care nu se recomandă păstrarea prin congelare a unor asemenea antigene. De asemenea, arbovirusul Blue Tongue prin congelare își pierde din infectivitate (Omori, citat de Ozawa, 1968), iar încercările de recuperare a virusului rujeolic din probele bioptice cu panencefalită sclerozantă subacută (PESS) au fost ineficiente cînd erau congelate la —20°C sau —70°C (păstrarea în azot lichid rezolvînd favorabil această problemă) (Albrecht și Schumacher, 1970).

Imensa majoritate a virusurilor însă sînt bine conservate prin îngheț timp îndelungat: virusul Aujeszky poate fi stocat cel puțin 160 de zile la —20°C ; virusul aftos, 4 luni la —40°C ; virusul gripal, minimum 5 luni la —70°C ; virusul pestei porcine, 6 luni la —20°C ; virusul rujeolic, pînă la 10 luni (cu pierderea progresivă a infectivității) ; virusul Carré, pînă la 1 an la —30°C ; virusurile poliomielitic și urlian, 1 an la —70°C ; virusul rabic, 2 ani și jumătate la —20°C, iar arbovirusul Denga, 12 ani la —70°C. Astăzi, pentru congelarea la temperaturi foarte scăzute, sub —70°C, se utilizează cu foarte bune rezultate azotul lichid, aerul lichid, izopentanul sau propanul răcit.

Alternarea repetată îngheț — dezgheț este suportată de unele virusuri fără pierderi importante ; astfel, virusul hepatitei A suportă fără modificări cicluri repetate congelare — decongelare, iar virusul febrei aftoase nu-și modifică titrul infectant după un asemenea tratament zilnic nici după 3 luni. Dimpotrivă, schimbările de temperatură de acest fel au un efect nefavorabil, soldîndu-se cu inactivarea unor virusuri, o influență de seamă avînd-o viteza de congelare — decongelare (cu cît mai bruscă, cu atît mai nocivă). Astfel, repetarea ciclului îngheț-dezgheț numai de 3 ori în cazul virusului rujeolic duce la scăderea infectivității sale cu 2 log (Cernescu, Sorodoc și Cajal, 1978) ; virusul bolii Newcastle, cu 3 log în 15 zile ; herpesvirusul — după 24 de repetări, iar virusul rabic fix prin congelări și decongelări repetate, aplicate substanței cerebrale virulente, a înregistrat atenuarea și chiar dispariția virulenței sale (Suslova, 1938).

4.2.1.2. *Umiditatea*

Hidratarea, diluțiile întinse, scăderea vîscozității au un caracter virulicid ; astfel, virusul herpes simplex suspendat în soluție fiziologică își pierde din activitatea sa patogenă (Jawetz și Coleman, 1952) ; virusul rabic în diluții mari, în soluții apoase, este distrus în cîteva ore ; virusul rujeolic este distrus într-un minut în proporție de 30—67%, funcție de umiditate (Jong, 1965). Mărirea vîscozității lichidelor (la 1,7 Centipoise) are o acțiune netă de protejare a virusului aftos, chiar în soluțiile care s-au dovedit defavorabile conservării (Tomescu și colab., 1960).

4.2.1.3. *Desicația*

Multă vreme controversat, acest agent fizic a căpătat în decursul anilor o importanță majoră, prin larga sa utilizare fie la atenuarea și inactivarea virusurilor, fie, dimpotrivă, la conservarea acestora timp îndelungat. Efectuată cu ajutorul temperaturii (căldura ori, dimpotrivă, frigul) sau a unor substanțe chimice (clorura de calciu, sulfatul de magneziu calcinat, hidroxidul de potasiu, acidul sulfuric concentrat etc.), desicația are efecte diferite asupra virusurilor funcție de :

— natura mediului în care este înglobat virusul (soluții, stabilizatori) sau materialului pe care se află depus virusul (sticla și metalele expun mai mult agentul la desicație, iar hîrtia de filtru, vata, pînza, dimpotrivă, protejează virusul de acțiunea distructivă a factorilor fizici) ;

— concentraţia virusului (virusul din lichidele diluate şi din serul sanguin este distrus mai repede prin desicaţie) ;

— pH-ul mediului (pH-ul 7,1—7,4 este favorabil unei conservabilităţi îndelungate) ;

— temperatura aplicată (căldura atenuează sau chiar distruge virusul, pe cînd frigul îl protejează şi conservă) ;

— durata expunerii, direct proporţională cu efectele obţinute ;

— viteza de reacţie (lentă — atenuează, rapidă — conservă virusul) ;

— condiţiile ulterioare de păstrare (lumina, temperatura, umiditatea şi aerarea avînd efecte negative).

Desicaţia lentă. Diminuează semnificativ puterea patogenă a germenilor virali, fenomen pe care se bazează de altfel principiul pasteurian de transformare a virusurilor în vaccinuri. Cercetările efectuate în ultimele decenii au demonstrat că desicarea utilizată pentru prepararea vaccinului antirabic, departe de a reprezenta un agent distructiv pentru virusul rabic, exercită, dimpotrivă, o activitate prezervativă asupra acestui virus şi-i conferă o capacitate mai mare de rezistenţă faţă de alţi agenţi nocivi. În continuare, de prezenţa sau de absenţa apei depind distrugerea sau conservarea virusului, căci, prin deshidratare, virusul este pus la adăpost de proteoliză, în timp ce în prezenţa apei, chiar şi numai sub formă de urme de umiditate, diastaza îşi exercită activitatea ei proteolitică, efectul virulicid, foarte intens în primele ore, descrescînd pe măsură ce progresează desicaţia (Remlinger şi Bailly, 1940).

Devenită clasică în atenuarea virusului rabic de stradă, metoda desicaţiei a fost aplicată şi altor virusuri, însă cu rezultate mai puţin remarcabile : virusul urlian izolat şi desicat a putut fi păstrat 7 săptămîni fără să-şi piardă virulenţa ; poliovirusul — aşa cum au arătat, în 1919, Lansteiner şi Levaditi — din fragmentele de măduvă de maimuţă era încă virulent după 24 de zile de menţinere în flaconul cu hidroxid de potasiu ; virusul aftos în diverse condiţii experimentale îşi poate păstra virulenţa de la 1 la 112 zile iar virusul pestos porcin, 5 zile.

Desicaţia rapidă. Metodă încă actuală de conservare a virusurilor, cu păstrarea integrală sau foarte puţin scăzută a capacităţii lor infectante, explică de altfel şi diseminarea naturală a multor viroze prin praful atmosferic.

4.2.1.4. *Liofilizarea*

Cu toate că virusurile sînt rezistente la temperaturi joase (—15°C, —20°C, —70°C), ele nu pot fi păstrate astfel multă vreme, deoarece nu se poate asigura o temperatură uniformă de lungă durată, datorită deficienţelor tehnice sau costului prea ridicat. Congelarea asociată cu presiunea negativă, şi desicaţia — liofilizarea — realizează însă unul dintre cele mai importante mijloace actuale în conservarea proprietăţilor biologice ale virusurilor şi de transport al antigenelor standard pentru laboratoarele de diagnostic.

Uscarea rapidă a substanţelor, prin sublimarea apei în vid, după o prealabilă congelare, a fost aplicată, pentru prima dată, în 1903, de către Van Steenberghe la conservarea infectivității virusului rabic, mai mult de 9 luni, prin uscarea materialului virulent în vid, în prezența acidului sulfuric. Timp de peste 80 de ani, această tehnică a fost permanent dezvoltată, modernizată și sofisticată, astăzi devenind cea mai utilizată metodă de stocare a virusurilor, începînd cu cele mai modeste laboratoare de specialitate, pînă la marile bănci și colecții de virusuri din lume.

Prin liofilizare pot fi conservate atît virusurile purificate, cît și cele încorporate în sînge, umori sau țesuturi vii de elecție ale fiecărui virus. După pregătirea materialelor virulente (exprimarea serului sanguin ori triturarea, broierea și suspendarea țesuturilor virulente), în procesul liofilizării intervin următorii factori :

a) Congelarea materialului (pierderea căldurii latente) poate fi :

— *lentă*, cu scăderea temperaturii în regimul 0,5—1°C/min ;

— *rapidă*, cu scăderea bruscă a temperaturii, cu cel puțin 100°C/s, acest procedeu fiind de preferat.

Problema de bază a liofilizării constă în alegerea și folosirea celei mai adecvate substanțe crioprotectoare. Dacă liofilizarea preparatelor virotice impure poate fi efectuată, de cele mai multe ori, fără adăugarea vreunei soluții protectoare, în cazul virusurilor purificate acest lucru nu este posibil, soluțiile bogate în albumine (2% albumină din plasma de bou, hidrolizatele albuminice) precum și serurile sau mediile nutritive mărind virulența germenilor liofilizați. Astfel, pentru stabilizarea unor virusuri, se recomandă următorii aditivi : peptona, cistina, tioglicolatul de sodiu sau soluția 0,15% de clorură de sodiu pentru poliovirus ; dimetilsulfoxidul (DMSO), gelatina-zaharoza, serumalbumina umană, hidrolizatul de cazeină — pentru virusul rujeolic ; serul uman, creierul și măduva infectată — pentru virusul rabic ; lichidul alantoidian sau soluția de peptonă 5% — pentru virusul gripal ; 10% MCA infectată în gălbenuș de ou — pentru virusul herpetic ; *guma Accaciae* sau serul normal bovin — pentru virusul aftos etc.

b) Uscarea în vid, prin sublimarea și eliminarea vaporilor formați, se realizează ținînd seama de temperatura de uscare (specifică fiecărui produs) și de punctul eutectic (limita maximă a temperaturii de înghețare a unei soluții saline). În final, se va acorda toată atenția la îndepărtarea umidității reziduale (conținutul în apă raportat la greutatea substanței complet uscate), care, altfel, ar conduce pe de o parte la degradarea produsului liofilizat, pe de alta, la pierderea rapidă a solubilității produselor uscate. În sfîrșit, închiderea fiolelor sub vid este o condiție esențială pentru o păstrare îndelungată a produselor liofilizate.

Conservabilitatea virusurilor liofilizate este variabilă, dependentă de virus, de condițiile de conservare (frig, întuneric), de calitatea sticlei (neutră, brună, opacă). Poliovirusul fără substanțe protectoare, destul de labil, ajunge în 1—4 săptămîni după liofilizare la o rată de supraviețuire sub 0,1% și un titru infectant foarte scăzut (Lozofskaia, 1959). Virusul herpetic își păstrează virulența aproape 8 luni ; virusul rujeolic, 10 luni ; virusul Aujeszky, 2 ani ; virusul rabic, 4 ani ; virusul aftos, 4 ani și jumătate, iar virusul variolic ovin, 10 ani.

4.2.1.5. *Ultrasunetele (vibrațiile sonice)*

Sînt unde acustice a căror frecvență depășește limita perceptibilității auditive umane (2×10^4 Hz/s); ele sînt produse în instalații de ultrasonare, prin trecerea unui curent electric alternativ de înaltă frecvență printr-un cristal de cuarț piezoelectric, care generează unde cu vibrații de peste 20 kHz/s, propagate într-un singur sens.

Aplicate virusurilor, ultrasunetele rămîn selectiv fără efect (ca în cazul virusurilor rujeolic și aftos) sau, dimpotrivă, le produc modificări structurale ori funcționale, mergînd de la exacerbarea proprietăților hemaglutinante (ca în cazul virusului gripal), creșterea virulenței (la virusul rabic, ca rezultat al dezagregării fragmentelor tisulare) și menținerea capacității antigenice intacte (la virusurile gripal și vaccinal, iar la poliovirus, chiar și în cazul distrucției sale totale), pînă la efecte contrare nocive — pierderea infectivității, inactivarea sau chiar distrugerea completă a virusurilor encefalitic și vaccinal; poliovirusul este dintre cele mai sensibile (chiar la 9 kHz/s), uneori însă cu reagregarea ulterioară a fragmentelor disrupte.

Electronooptic, Dumitrescu, Zaharia și Petrescu (1984), în Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau", au observat la virusul gripal în suspensie, sonicat cu 20 kHz, la 600 W, alterări drastice ale morfologiei particulelor virale, gradat crescute în intensitate, funcție de durata expunerii. Acestea constau în detașări ale componentelor de suprafață, distrugeri ale corpusculilor virali și ale elementelor lor constitutive, apariția de „fantome" și componente virale aglomerate, diferite ca mărime și orientare.

Rezultatele comunicate sînt însă de multe ori controversate (Nicolau, 1956) și aceasta în mare măsură datorită condițiilor experimentale diferite, în care trebuie luați în considerație numeroși parametri: dimensiunea și structura corpusculului elementar, concentrația virusului, impuritatea mediului, soluția de suspensie utilizată, prezența proteinelor în mediu (care au un rol cert protector), temperatura, precum și parametrii cîmpului ultrasonic (frecvența undelor, wattajul, durata expunerii la ultrasonare etc.).

Mecanismul de acțiune al ultrasunetelor este de asemenea controversat (Vasilescu, 1984). Rolul principal este atribuit fie efectului chimic (ionizarea gazelor din lichidul expus vibrațiilor sonore, urmată de degajarea de hidrogen peroxidat, oxid și bioxid de azot), fie efectului fizic de intensă traumatizare a corpusculilor virulenți (provocată de fluxul electronic, însoțit de producerea de radiații ultraviolete, cu consecințe fotochimice), fie, în sfîrșit, efectelor de cavitație (în care sînt implicate presiuni înalte, de mii de atmosfere, în interiorul bulelor realizate în mediul lichid).

Aplicațiile tehnologice ale ultrasunetelor sînt multiple. Astăzi sînt utilizate cu succes la eliberarea virusurilor din celule (metodă mult mai eficace decît metoda criogenă sau cea mecanică), la dezintegrarea celulară și recuperarea virusurilor, omogenizarea suspensiilor prin disociere sau disrupție a virionilor (în vederea separării componentelor subvirale), separarea și purificarea virusurilor, reducerea considerabilă a infectivităţii, extracţia antigenelor cu proprietăţile conservate şi active, inactivarea virală, precum şi pentru studii conformaţionale şi cunoaşterea structurilor corpusculului viral (prin corelare cu difuzia luminii, absorbţia şi determinarea emisiei spectrofotometrice) (Zaharia şi Petrescu, 1984).

4.2.1.6. *Presiunile înalte (ultrapresiunea)*

Realizată în corpuri de pompă, cu ajutorul unui piston metalic, presiunea de cîteva mii de atmosfere are un efect inactivant asupra capacităţii patogene a virusurilor. Astfel, după Levaditi, arbovirusurile sînt inactivate sau distruse la 2 000—3 000 atm ; virusul herpetic, la 3 000 atm ; virusul rabic fix, la 5 000 atm ; virusul papilomului Shope, la 6 000 atm ; virusul bolii Borna, la 7 000 atm, iar poliovirusul — la 10 000 atm. Cu toate aceste rezultate obţinute, putem conchide că metoda nu a îndreptăţit speranţele în aplicarea sa pe scară largă în virusologie.

4.2.1.7. *Presiunea osmotică*

Forţa care determină trecerea unei anumite substanţe dizolvate prin membrane, presiunea osmotică, este direct proporţională cu concentraţia din soluţie (depinzînd de numărul moleculelor din soluţie şi nu de natura substanţei dizolvate) ; în soluţii, concentraţiile molare similare ale diferitelor substanţe au aceeaşi presiune osmotică, aceasta fiind egală cu 22,42 atm/mol. Determinarea presiunii osmotice (P_{osm}) a unei substanţe se face după relaţia :

$$P_{osm} = 22,42 \times C_{mol}$$

prin urmare, mutiplicînd presiunea de 22,42 atm pe care o exercită molecula-gram de solvat sau solvent cu concentraţia molară (C_{mol}) respectivă.

Presiunea osmotică a mediului asupra virusurilor are o acţiune puţin evidentă ; în mod incontestabil însă rezistenţa virusurilor purificate este mai mare în apa distilată decît în diversele soluţii saline. Hovel (1971) arată că virusul rujeolic, ca şi poliovirusul, în medii hipertonice, determină apariţia unui număr crescut de plaje, iar în cele hipotonice, dimpotrivă, un număr scăzut. Valorile optime ale presiunii osmotice fiind de 430 m osm (molaritate osmotică), efectul toxic osmotic pentru celule este apreciat la 500 m osm, realizat prin creşterea exagerată a concentraţiei saline, spre exemplu a mediului Hanks.

Concentraţia molară a substanţelor dizolvate este direct proporţională cu coborîrea punctului de îngheţare (Δ), conform legii lui Raoult : punctul de îngheţare al apei coboară cu 1,85°C pentru fiecare moleculă-gram de substanţă dizolvată, după relaţia :

$$\Delta = k \times C_{mol}$$

unde k este un coeficient care depinde de natura şi cantitatea solventului, dar independent de natura corpului dizolvat.

Virusurile — paraziţi obligatorii ai celulelor vii — preferă izotonia mediului de cultură conferită de soluţiile echimolare, cu o presiune osmotică corespunzătoare unui punct crioscopic $\Delta = -0{,}60^\circ C$; orice deviere de la valoarea optimă se exprimă printr-o acţiune inhibitoare direct proporţională.

4.2.1.8. *Forţa gravitaţională*

Filtrabilitatea virusurilor animale, dovedită pentru prima dată, în 1897, de Löffler şi Frosch pentru virusul febrei aftoase, sugera că inframicrobii au o talie foarte redusă. Filtrarea preparatelor virale prin membrane de colodiu cu porozităţi cunoscute i-a permis lui Elford, în 1931, să stabilească pentru prima dată că virusurile posedă mărimi diferite şi caracteristice, astăzi cunoscute a se integra între 10 nm şi 260 nm (tabelul 4-I), chlamydiile şi rickettsiile depăşindu-le (270 nm şi respectiv 475 nm).

TABELUL 4-I

Diametrul sau diametrele inegale ale unor virusuri

Diametrul (nm)	Virusul	Diametrul (nm)	Virusul
210×260	Vaccinal	70	Pestos aviar
130	Herpes simplex	45	Papilomului Shope
125	Rabic fix	27	Coxsackie
115	NDV	27	Poliomielitic
65×165	Stomatitei veziculoase	22	Amaril
85	Gripal	21	Aftos
75	Adeno	18	Encefalitei japoneze B

Cea mai slabă dintre cele patru forţe fundamentale ale naturii — gravitaţia naturală —, de atracţie pe verticală cu o forţă potenţială proporţională cu masa şi poziţia obiectului faţă de centrul pămîntului, are o influenţă practic nulă asupra virusurilor, datorită dimensiunilor virionilor şi maselor lor atît de mici. Acceleraţia gravitaţională normală, sau standard (*g*), este egală cu 9,80665 m/s^2 şi este uzual notată 9,81 m/s^2.

Forţa gravitaţională artificială (centrifugală) însă, dezvoltată prin centrifugare sau ultracentrifugare, duce la deplasarea şi sedimentarea virusurilor, iar atunci cînd cîmpul gravitaţional este cu totul considerabil forţa brutală a gravitaţiei conduce, în plus, la degradarea corpusculului viral.

Astăzi, ultracentrifugarea este larg utilizată în virusologie pentru sedimentarea rapidă a virusurilor în scop analitic (pentru caracterizarea parametrilor fizici ai particulei virale) sau preparativ (concentrarea şi purificarea virusurilor din produse biologice brute).

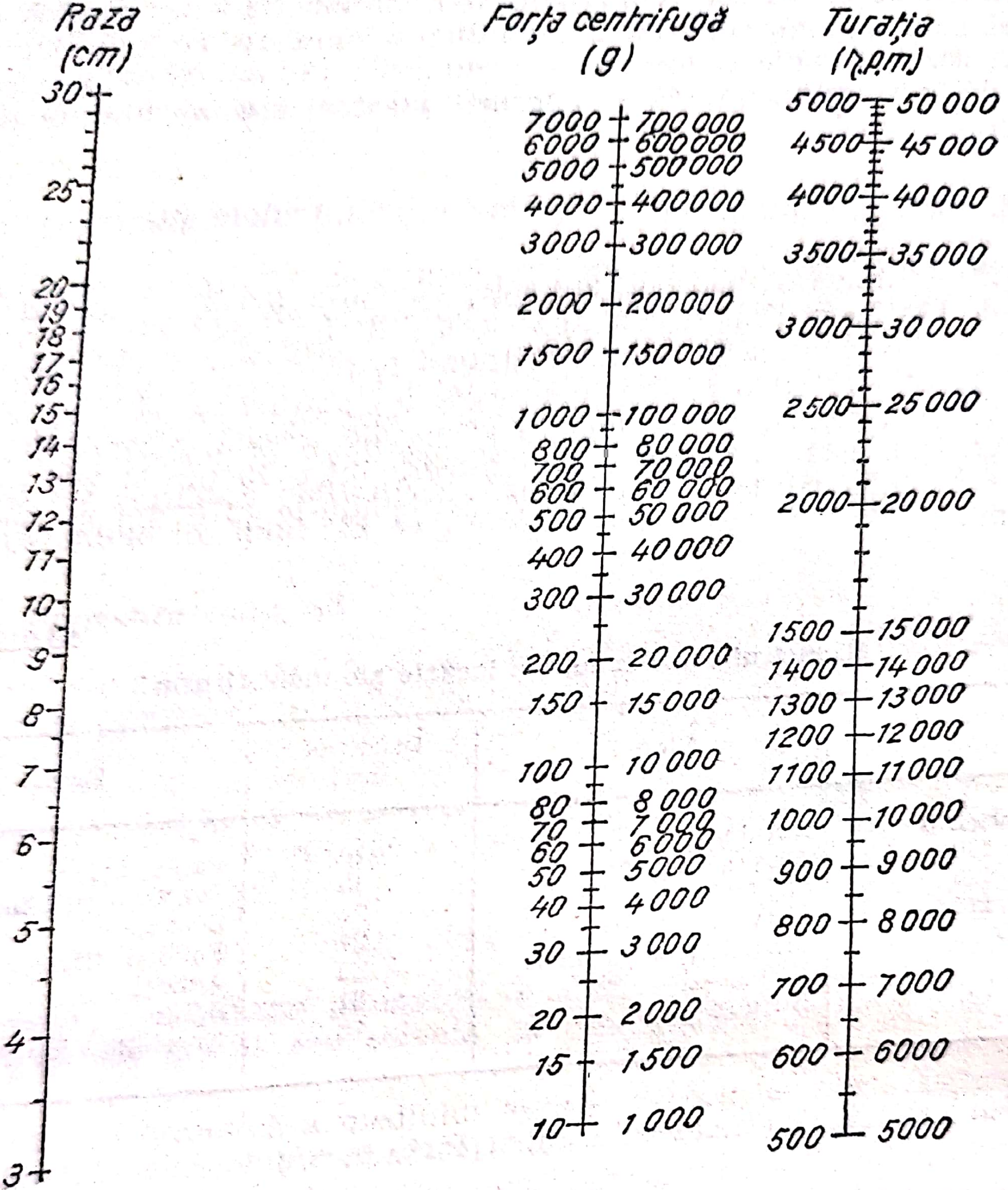


Fig. 4-1 — Nomogramă cu echivalențe între raza rotorului centrifugal (în cm), forța centrifugală realizată (în *g*) și turația rotorului centrifugal (în r.p.m.).

Durata sedimentării este direct proporțională cu greutatea moleculară a virusului, cu raza rotorului centrifugii și viteza sa de rotație (fig. 4-1 și 4-2).

Sub influența unui cîmp centrifugal, particulele virale se deplasează prin mediul lichid cu o viteză dedusă după formula :

$$s = \frac{v}{\;} = \frac{m_p\left(1-\frac{d_0}{d}\right)}{f}$$

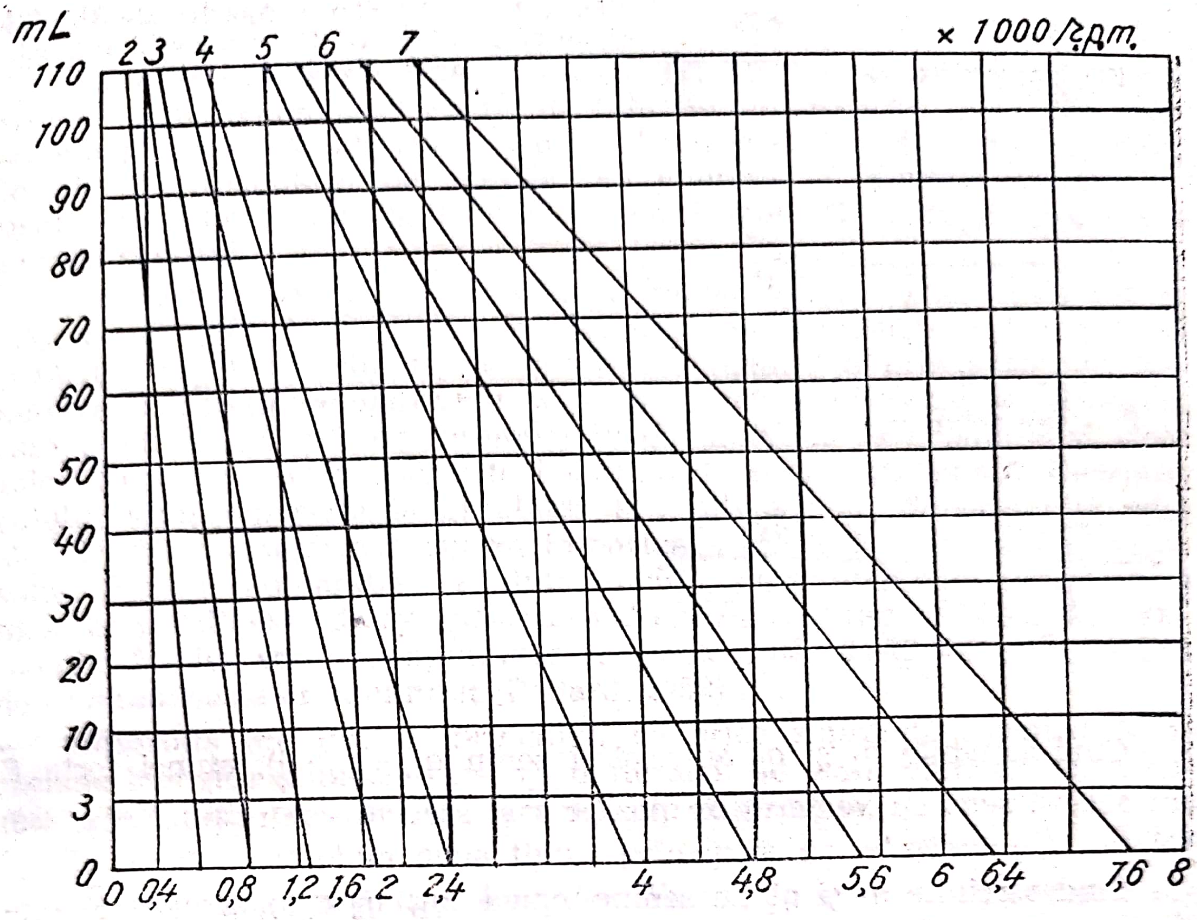


Fig. 4-2 — Nomogramă cu echivalențe între volumul lichidului de centrifugat (în mL), turația rotorului centrifugal (în r.p.m.) și forța centrifugală realizată (în g) la rotorul *Swing out* de 4×100 mL.

în care : s = coeficientul de sedimentare ; v = viteza de deplasare ; g = accelerația în cîmp ; m_p = masa particulei ; d și d_o = densitățile particulei și respectiv ale lichidului ; f = factor de proporționalitate.

Prin urmare, coeficientul de sedimentare al particulei este direct proporțional cu masa particulei și invers proporțional cu coeficientul de fricțiune.

4.2.1.9. *Cîmpul electric*

Cîmpul electric, formă de existență a materiei din jurul corpurilor electrizate, se manifestă prin acțiuni asupra corpurilor cu sarcină electrică.

Intensitatea cîmpului electric $\vec{E}$ este egală cu raportul dintre forța $\vec{F}$ cu care acționează cîmpul asupra unui corp de probă* aflat în acel punct și sarcina electrică q a corpului de probă :

$$\vec{E} = \frac{\vec{F}}{q}$$

---

* Corp de dimensiuni mici, încărcat electric.

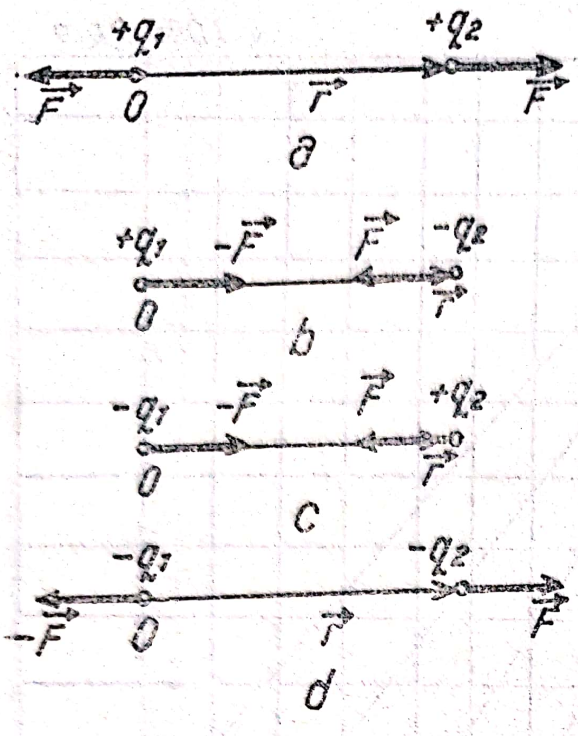


Fig. 4-3 — Orientarea forțelor de interacțiune electrică (după Gherbanovski și colab., 1982) (detalii în text).

Cînd sarcinile q_1 și q_2 au același semn q_1, $q_2 > 0$), atunci forța $\vec{F}$ are același sens cu vectorul de poziție $\vec{r}$ și sarcinile se resping (fig. 4-3, *a* și *d*).

Cînd sarcinile q_1 și q_2 au semne opuse q_1, $q_2 < 0$), atunci $\vec{F}$ este de sens opus lui $\vec{r}$ și sarcinile se atrag (fig. 4-3, *b* și *c*).

Electroforeza. Tehnicile bazate pe proprietatea pe care o au atît virusurile, cît și toate substanțele proteice de a migra într-un cîmp electric s-au dezvoltat și implicat enorm în procesele de caracterizare și purificare a virusurilor. Prin stabilirea mobilității electroforetice în condiții standard, o proprietate a virusurilor poate fi determinată și comparată cu alte proprietăți fizice, așa cum sînt densitatea, coeficientul de sedimentare și mărimea virusurilor.

Unele virusuri — cum sînt virusurile plantelor — pot fi identificate cu ajutorul electroforezei și informația este cu atît mai importantă, cu cît diferite virusuri pot provoca simptome asemănătoare la plante. Virusurile animale pot fi studiate cu mai mare acuratețe prin electroforeză, după o prealabilă purificare, putînd fi ușor deosebite de proteinele contaminante.

Electrodinizarea (catadinizarea). Expunerea germenilor la acțiunea ionilor metalici rezultați în urma trecerii prin apă a unui curent electric între doi electrozi de argint (apă ionizată) inactivează unele virusuri și bacterii. Prin acest procedeu, Duca și colab. (1954) au obținut în 24 de ore inactivarea virusului rabic și transformarea lui în vaccin rabic, care și-a conservat calitățile imunogene timp de 60—120 de zile.

4.2.1.10. *Adsorbția*

Adsorbția, fenomen molecular de suprafață, se realizează între două sisteme prin fixarea unei substanțe solubile de suporturi insolubile. Adsorbția pe suportul adsorbant are loc fie nespecific, ca efect al acțiunii forțelor electrostatice, fie specific, ca expresie a afinității virusurilor pentru receptorii celulari, datorită căreia, în condiții fiziologice, se leagă în mod specific.

Fenomenul este de o covîrșitoare importanță în virusologie, atît în ceea ce privește posibilitatea speciei de a supraviețui (virusurile fiind paraziți obligatorii celulari, ce își asigură replicarea prin adsorbție, penetrare și infecție celulară), cît și pentru imensul domeniu al serologiei, care joacă un rol atît de însemnat în diagnosticul de laborator al virozelor. Realizarea adsorbției este facilitată de suprafața imensă a corpusculului viral raportată la greutatea sa ; într-adevăr, dimensiunile mici ale virionilor exagerează enorm importanța relativă a suprafeței virusului. Pentru comparație, la ființa umană, raportul dintre suprafață și masa corporală este de aproximativ 0,3 cm^2/g, în timp ce la virusul mozaicului fasolei, spre exemplu, este de aproximativ 3 000 000 cm^2/g, adică de 10 milioane de ori mai mult (Pollard, 1953).

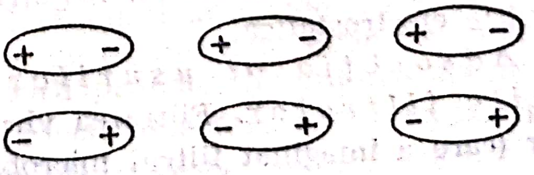
Adsorbția are loc, în principiu, pe orice suprafață ; pentru fenomenele biofizice și biochimice discutate aici, ne vom referi pe scurt numai la adsorbția pe suprafețe caracteristic adsorbante.

În esență, deosebim două tipuri principale de adsorbție :

— adsorbția fizică (sau *Van der Waals*), în care se încadrează adsorbția virusurilor pe suprafețe inerte ; este nespecifică și se caracterizează prin călduri de adsorbție cuprinse între 5—10 kcal/mol de adsorbit ; aceste călduri sînt de ordinul căldurilor de vaporizare a lichidelor, ceea ce arată că forțele de adsorbție Van de Waals sînt de același ordin de mărime ca și forțele de coeziune din lichide ; acest tip de legătură este relativ slabă și se realizează între atomi cu pături electronice exterioare complete sau între molecule cu legături chimice saturate. Între mișcarea electronilor a doi atomi apropiați se poate stabili o corelație care duce la apariția unei forțe de atracție (fig. 4-4 și 4-5) sau de respingere (dipoli electrici momentani) ;

— adsorbția activată *(chemosorbția)*, cu călduri de adsorbție cuprinse între 10—100 kcal/mol (Nicolau și Simon, 1968) ; forțele care rețin adsorbitul pe suprafața adsorbantului sînt forțe de legătură chimice. Acest tip de adsorbție este implicată, pe de o parte, în adsorbția virusurilor pe hematii, anticorpi, celule etc. — caracteristică în fenomenele de agregare, aglutinare, precipitare, neutralizare, fixare a complementului etc. (în general în reacția antigen — anticorp) ; pe de altă parte, este

Fig. 4-4 — **Ordonarea moleculelor polare datorită interacțiunii electrostatice (după Ciobotaru și colab., 1982).**



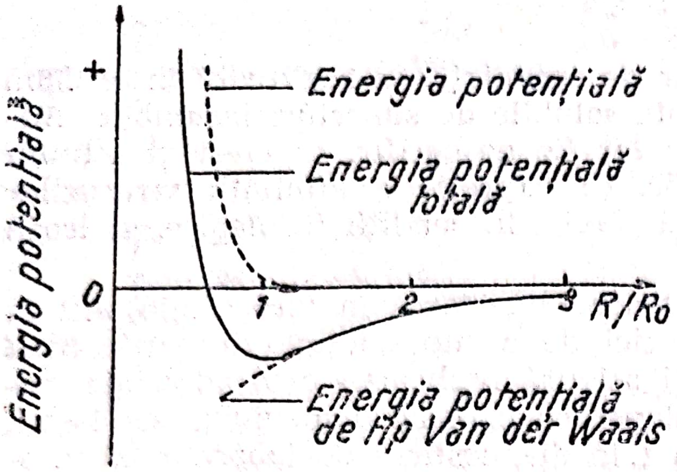


Fig. 4-5 — Reprezentarea schematică a energiilor de atracție, respingere și a energiei potențiale totale în cazul legăturii de tip Van der Waals. Legătura este stabilă cînd distanța interatomică este egală cu R, (după Ciobotaru și colab., 1982).

implicată ca prim pas în adsorbția virusurilor pe celulele animale, pasul următor fiind penetrarea virusului în celulă și infecția.

Adsorbția — eluția. Adsorbția în domeniul virusologiei nu este un fenomen unic, definitiv, ci reversibil, eluția fiind fenomenul de desorbție, de eliberare a virusului din complexul adsorbant — adsorbit.

Eluția a fost descrisă pentru prima dată de Hirst (1943), care, punînd în contact la 37°C hematii de găină cu virus gripal, a observat desorbția spontană a acestuia în mediu. S-a stabilit apoi că eluția virusului poate fi provocată prin modificarea factorilor fizici (termici, sarcini electrice), chimici [pH, adaos de RDE *(Receptor Destroying Enzyme)*] ori fizico-chimici, simpla spălare cu apă nefiind suficientă. Dimpotrivă, eluția poate fi împiedicată cînd, spre exemplu, eritrocitele de pasăre sau de om sînt tratate cu metaperiodat 0,2—2,0 mg/mL celule, virusul fiind adsorbit, dar nemaiputînd elua de pe celulele periodate (Hirst, 1948).

Adsorbția nespecifică a virusurilor pe substanțe inerte. În ultimii ani s-a demonstrat că printre metodele de concentrare a virusurilor din ape, o mare eficiență la enterovirusuri o prezintă tehnica fondată pe adsorbția — eluția pe/de pe pudra de sticlă. Principiul acestei metode se bazează pe faptul că virusurile sînt amfotere. La un pH inferior punctului lor izoelectric, ele sînt încărcate pozitiv și sînt deci susceptibile să adsoarbă pe un suport de încărcătură negativă constantă și independent de pH. Dimpotrivă, la un pH superior punctului lor izoelectric, fiind încărcate negativ, ele au tendința de a se separa de suport și deci să se desoarbă. Punctul izoelectric nefiind determinat încă la toate virusurile, Collomb și colab. au determinat, în 1986, condițiile optime de adsorbție pe pudra de sticlă ale coronavirusurilor marcate cu ^{14}C, apoi eluția acestora, funcție de pH-ul apei. Ionii de aluminiu (Al^{3+}) s-au dovedit a mări randamentul adsorbției, iar la pH alcalin pudra de sticlă și virusurile fiind încărcate negativ, acestea din urmă se desorb prin repulsie electrostatică.

Adsorbția virusurilor și bacteriilor pe porozitățile filtrelor. Filtrarea virusurilor, fenomen descoperit de Pasteur (care a imaginat filtrul microbian), nu este „o simplă trecere prin sită“ a unei suspensii de virusuri și bacterii, ci un fenomen complex de adsorbție. Fiind trecut printr-o substanță poroasă (caolin, kiselgur, azbest, porțelan poros etc.), la o presiune de maximum 20—40 mmHg, lichidul se debarasează de bacterii (care rămîn pe filtru), virusurile regăsindu-se în lichidul filtrat. Pornind de la observația că filtrele Chamberland L_3 din caolin, cu porozitatea de 20 μm diametru, rețin corpusculii cu diametrul de numai 1—2 μm, s-a stabilit că fenomenul capital este adsorbția. Filtrarea este prin urmare dependentă nu numai de diametrul canaliculelor filtrelor, ci și de suprafața adsorbantă, tensiunea interfacială, temperatură, pH și de încărcarea electrică a filtrului în raport cu sarcina electrică a corpusculilor.

Astăzi este bine precizat că filtrele silicioase (tip Berkefeld, spre exemplu) au o încărcătură electrică negativă, cele de gips — pozitivă, astfel că virusul rabic (ca majoritatea virusurilor avînd sarcină electrică negativă) trece prin filtrul Berkefeld, fiind însă reținut în filtrele de gips.

Adsorbția virusurilor pe substanțe pulverulente. Adsorbția virusurilor se poate demonstra experimental amestecînd suspensia de virus cu o pulbere inertă ; astfel, virusul rabic fix în emulsie, amestecat cu o pulbere de cărbune animal, apoi centrifugat, este antrenat în sedimentul de pulbere inertă, fiind total absent în lichidul spernatant. Asemenea rezultate au fost obținute în 1923, de Levaditi, cu virusurile rabic de stradă, vaccinal, herpetic ș.a. pe o serie de pulberi (caolin, cărbune animal, fosfat tricalcic). Adsorbția reovirusurilor pe caolin se face astăzi după o metodologie standardizată : 25 g caolin, spălat cu acid și suspendat 25% în TFS (tampon fosfat salin), se adaugă în tubul conic de centrifugă la specimenul de ser diluat 1 : 5 ; mixtura caolin — ser este incubată 20 min la temperatura laboratorului, se agită viguros, se centrifughează 10 min la 1 800 de rotații pe minut (r.p.m.) și se îndepărtează supernatantul.

Adsorbția virusurilor pe substanțe adjuvante imunologice. Dintre adjuvantele imunologice testate (tapioca, coloidul anorganic, glicerina, alcoolul de parafină, fosfatul de calciu, geloza, alaunul, latexul, saponina ș.a.), hidroxidul de aluminiu [$Al(OH)_3$] s-a dovedit a fi cel mai eficient, adsorbindu-se complet și conferind o imunitate activă.

Explicația fenomenului, după Prigge (citat de Nicolau și colab., 1961), constă în faptul că aceste substanțe — care prezintă o suprafață minimă în raport cu mediul exterior — sînt transformate într-o stare fizică nouă dacă această suprafață este mărită.

Virusul adsorbit pe gelul de hidroxid de aluminiu rămîne îndelung cantonat la locul de inoculare, unde își pierde patogenitatea (însă cu conservarea puterii imunizante) și de unde eluează treptat, resorbindu-se cu întîrziere în torentul circulator, pătrunzînd și difuzînd lent, dar continuu, în organism, prelungind astfel stimulul antigenic. În aceste condiții anticorpii neutralizanți și fixatori de complement apar mai precoce, conferind o eficacitate deplină vaccinării primare, imunitatea apărînd și ea precoce, activă, solidă și durabilă. Inocuitatea acestui vaccin este perfectă, el nu creează purtători și eliminatori de virus.

Ionul de Al^{3+}, pe de altă parte, provoacă modificări ale formulei leucocitare, fiind însă toxic în doze mari ; el provoacă modificări în plămîn, caracterizate printr-o îngroșare a septurilor, datorită reacției histiocitare, proliferării endoteliului alveolar și edemelor locale. Datorită acestor modificări ce au loc în plămîn, organ ce funcționează intens în anotimpul călduros, s-ar putea explica instalarea unei imunități mai slabe în cursul verii la animalele imunizate cu vaccin formolat și adsorbit pe hidroxid de aluminiu.

Gelul de hidroxid de aluminiu se folosește ca adsorbant și stimulant al imunității la o serie de vaccinuri vii inframicrobiene : rabic, poliomielitic, aftos, pestos, contra bolii Aujeszky, iar, experimental, la vaccinul gripal.

Adsorbția și eluția virusurilor pe rășini schimbătoare de ioni. Cromatografia pe coloană a fost definită de Martin (1950) ca o filtrare uniformă a unui lichid printr-o coloană umplută cu o substanță divizată mai mult sau mai puțin fin, care reține selectiv unele componente ale lichidului.

Diferitele tipuri de adsorbanți utilizați în cromatografie au fost clasificați după forțele predominante care produc reținerea. Cromatografia de adsorbție este rezultatul interacțiunilor dipol, forțelor Van der Waals sau dispersiei London și legăturilor de hidrogen între solvat și adsorbant. Legăturile ionice dintre solvat și adsorbant au fost definite cromatografic pe coloane schimbătoare de ioni și aplicate la separarea macromoleculelor — proteine și virusuri.

Funcție de încărcătura electrică a virusului, coloanele schimbătoare de ioni folosesc ca adsorbant fie rășini schimbătoare de cationi (în acest caz adsorbția avînd loc numai la concentrații înalte de săruri — 0,1 M, iar adsorbția la concentrații extrem de înalte — 1,8 M), fie, dimpotrivă, schimbători anionici, care adsorb virusul la concentrații joase de săruri.

Eluția virusului de pe adsorbant se face la rece (4°C), cu un tampon adecvat, la pH fiziologic, în gradient de concentrație de săruri.

Adsorbția virusurilor pe hematii. Fenomen fizico-chimic de suprafață, adsorbția virusurilor pe hematii se soldează cu formarea de punți de legătură între hematii, pe care le aglutinează, permițînd observarea lor cu ochiul liber.

Adsorbția directă. Se realizează prin punerea în contact a unei suspensii virale cu hematii normale, neprelucrate în prealabil.

Purificarea prin adsorbție și eluție. Această metodă a fost utilizată mulți ani, după descrierea ei de către Hoyle și colab. (1954), pentru purificarea myxovirusurilor, probabil datorită modului caracteristic de maturare al acestor virusuri care conțin mari cantități de material contaminat de celulele-gazdă de origine. Procesul constă în adsorbția virusului brut, proaspăt recoltat la rece, de anumite celule (roșii), urmată de spălare și eluare timp de 4 ore, la 37°C. Virusul concentrat se separă prin centrifugare.

Hemaglutinarea (HA). În 1941, Hirst a constatat că virusul gripal cultivat în cavitatea alantoidiană a oului de găină embrionat aglutinează eritrocitele de pasăre, cobai și hematiile umane ; particulele virale sînt adsorbite pe suprafața celulelor roșii, formînd punți între eritrocite. Atunci cînd însă sînt tratate cu RDE, celulele nu mai adsorb virusul, această enzimă — extrasă de Burnet și colab. (1946) din vibrionul holerei — modificînd încărcarea electrică a hematiilor.

Hemaglutinarea virală este în esență un fenomen de adsorbție; deoarece căldura de adsorbție (neimplicînd puternic legăturile chimice) este de obicei mică, hemaglutinarea virală are loc foarte bine la 0°C. Cînd Hirst (1942) a pus în reacție virusul și celulele roșii la 37°C, adsorbția pe eritrocite a fost urmată de eluția spontană a virusului în mediu. Faptul că acest fenomen de adsorbție — desorbție implica mai mult decît un procedeu fizic, s-a văzut în urma observației că, deși suprafața virusului rămînea intactă după eluție, celula roșie era ireversibil modificată, încît nu mai era capabilă de o nouă adsorbție sau aglutinare. Hirst a recunoscut clar asemănarea fenomenului descris cu interacțiunea enzimă-substrat.

Hemaglutinoinhibarea (inhibarea hemaglutinării, HAI), după cum se știe, asigură specificitatea reacției de hemaglutinare prin evidențierea anticorpilor specifici hemaglutinoinhibanți față de antigenul care, neutralizat, nu mai permite aglutinarea eritrocitelor.

Adsorbția indirectă (pasivă) are loc atunci cînd celulele (roșii) sînt pretratate cu anumite substanțe chimice și/sau acoperite cu anticorpi omologi, pentru a permite adsorbția virusului adăugat la sistem.

Hemaglutinarea pasivă (HAP) presupune sensibilizarea prealabilă a hematiilor cu acid tanic, formol sau clorură cromică, fapt ce capacitează hematiile ca „transportor“ de virus; aglutinarea hematiilor tanate sau formolate sub acțiunea serului specific și menținerea în contact cu virusurile urliene, Newcastle, herpetice, poliomielitice sau adenovirale este comparabilă și chiar superioară altor reacții serologice (Cajal, 1964).

Hemaglutinarea pasivă inversă (HAPI). În cadrul acesteia virusul interacționează cu anticorpii omologi, pe care îi aglutinează sub formă de grunji. Posibilitatea păstrării timp îndelungat a hematiilor în azot lichid și confirmarea rezultatelor printr-un test de neutralizare conferă reacției atribute suplimentare pentru o utilizare în screening-uri largi de depistare a AgHBs, precum și a purătorilor de HBV donatori de sînge.

Adsorbția virusurilor pe anticorpi. Anticorpii — proteine specifice ce aparțin unui grup heterogen de imunoglobuline serice (Ig), care apar în sînge și în alte umori, fiind și sintetizați de plasmocite în urma contactului cu antigenul — au capacitatea de a se combina necovalent, prin situsurile de combinare localizate în fragmentul Fab, cu determinantul antigenic corespondent.

Răspunzînd la invazia virală prin producerea de anticorpi față de una sau mai multe din proteinele de la suprafața și uneori din interiorul corpusculului elementar, aceste imunoglobuline formează în mod natural *in vitro* complexe antigen — anticorp, neutralizînd virusul agresor, fiind folosite la reacțiile serologice *in vitro* pentru diagnosticul de laborator al virozelor.

În reacția dintre antigen și anticorp se pot distinge două etape: în *prima etapă*, de combinare specifică (ce poate fi pusă în evidență prin radioimunodifuzie, radioimunoelectroforeză ori imunofluorescență), antigenul se unește rapid cu anticorpul, avînd ca rezultat formarea unui complex antigen — anticorp solubil ; reacția este urmată, după aproximativ 30 min, de *etapa secundară*, observabilă, al cărei rezultat este formarea complexului antigen — anticorp insolubil, cu apariția aglutinării, precipitării, fixării complementului.

Adsorbția virusurilor in vivo. Cercetări moderne au demonstrat că adsorbția virusurilor se realizează nu numai experimental, în scop diagnostic, în eprubetă, ci și în organismul uman.

Complexele imune (CI). Principala caracteristică a fiecărei molecule de Ig este capacitatea sa de a reacționa specific cu un anumit antigen, față de care posedă o structură complementară (situs de combinare), reacție însoțită de formarea unui complex antigen — anticorp (complex imun) ; acest complex este o asociație macromoleculară dintre moleculele de antigen și anticorp legate specific între ele, prezent sub formă *solubilă* (complex imun circulant, CIC), dacă reacția s-a produs în exces de antigen, sau sub formă *insolubilă*, de precipitat, dacă cei doi reactanți s-au combinat la echivalență (complexe imune depuse, precipitate).

Generarea CI este o consecință a persistenței în organism a antigenelor și stimulării continue a aparatului celular imun capabil să genereze anticorpi, dar inapt să debaraseze organismul atît de antigene, cît și de CI antigen — anticorp. Formarea CI este un fenomen fiziologic normal, care apare în orice răspuns imun eficient, precipitarea și depunerea lor în țesuturi constituind o secvență de reacții care devin patologice numai în condiții speciale, de unire a complexelor în macroagregate ce vor precipita, determinînd leziunile din țesuturi.

CIC pot rămîne mult timp în circulație, cînd complexele au calități fizice defectuoase sau, dimpotrivă, pot fi eliminate rapid din circulație atunci cînd macrofagele le captează și le degradează foarte activ (Berceanu și Păunescu, 1981).

Cînd starea de echilibru se modifică, CI sînt captate și sechestrate în vase prin efracția complexelor, care precipită și se depun între membrana bazală și endoteliul vascular. Efectul nociv se traduce prin leziuni inflamatoare, care evoluează distructiv pînă la degenerescență.

Adsorbția virusurilor in vitro se poate face pe anticorpi normali sau pe anticorpi marcați.

A. *Adsorbția virusurilor pe anticorpi normali.* Se realizează prin următoarele reacții :

1. Agregarea. Este un mod de adsorbție în care sînt folosite mai multe metode.

a) Agregarea virusurilor de particule inerte învelite cu anticorpi. Inspirată din reacția de evidențiere a anticorpilor antigripali prin agregarea lor de particule de cărbune, metoda a fost introdusă inițial de Leach (1971) — care a folosit particule inerte de latex învelite cu anticorpi anti-HBs — și apoi a fost larg aplicată de Malin și Edwards (1972) în diagnosticul serologic al hepatitei virale B. Folosirea de particule de latex sau suspensia fină de cărbune, învelite cu anticorpi anti-HBs, pot servi ca reactiv pentru decelarea anticorpilor anti-HBs printr-o reacție de inhibare, serurile care conțin AgHBs producînd inhibarea agregării.

b) Agregarea — flocularea. Reacția, semnalată de Kachani și Gocke (1973), constă din agregarea și flocularea concomitentă în prezența AgHBs a unor particule acrilice învelite cu anticorpi anti-HBs, inactivați prin căldură (56°C) ; reacțiile fals-pozitive necesită a fi evidențiate prin testarea paralelă cu suspensii de particule învelite în globulină normală.

c) Agregarea antigen — anticorp. Metoda, propusă de Almeida și Waterson (1969), constă în formarea de agregate antigen — anticorp, ca urmare a adaosului de imunoser anti-HBs la serurile de cercetat, datorită concentrării particulelor de antigen în cadrul complexului imun (complex pus în evidență prin microscopie electronică).

2. *Aglutinarea.* Este o interacțiune secundară antigen — anticorp, ce determină formarea de aglomerate în suspensie, macroscopic vizibile, utilizată pentru identificarea — cu ajutorul unui antiser cunoscut — a unor virusuri izolate.

Aglutinarea apare numai în prezența ionilor de Na^+ și se desfășoară în două etape : *prima fază* este reprezentată de unirea specifică a antigenului cu anticorpul corespunzător, realizîndu-se complexul antigen — anticorp ; *faza a doua,* nespecifică, constituie un fenomen pur fizico-chimic ce constă în aglomerarea și alipirea complexelor inițiale antigen — anticorp, determinate de prezența electroliților (Na^+Cl^-), și transformarea lor în complexe secundare.

Aglutinarea poate fi directă sau indirectă.

a) Aglutinarea directă cuprinde :

— *Aglutinarea corpusculilor elementari.* Reacția se bazează pe aglutinarea corpusculilor elementari specifici sub acțiunea imunoserului, după un contact prelungit. Metoda, cu aplicabilitate restrînsă în domeniul virozelor (variolo-vaccina, varicela, herpes zoster), are însă o largă utilizare în diagnosticul inframicrobilor de talie mare [limfogranulomatoza infecțioasă, psittacoza și mai cu seamă rickettsiozele (febrele exantematice, febra Q etc.)].

— *Reacția de microaglutinare* este un test care necesită — în afara materialelor obișnuite la executarea reacțiilor serologice — o cameră umedă sterilă, în care se mențin lamele cu preparatele recoltate din plăcile Tacacz.

o) Aglutinarea indirectă (pasivă). Reacția antigen — anticorp în care imunoglobulina aglutinează virusul adsorbit inițial pe diverse substraturi prezintă avantajul unei mari sensibilități (Friedman și Benett, 1957), însă poate furniza uneori rezultate nespecifice, atribuite unor diverși factori : impuritatea reactivilor utilizați și a apei distilate, uscarea insuficientă a materialelor de laborator etc.

— *Aglutinarea virus-bacteriană (AVB)* este o reacție folosită în diagnosticul encefalitei de St. Louis, poliomielitei, rujeolei, gripei și encefalomielitei ecvine.

Principiul reacției constă în apariția aglutinării bacteriilor omorîte *(Serratia marcescens)* și încărcate cu inframicrobi de către serul specific antiinframicrobian, aglutinare citită apoi la aglutinoscop.

— *Aglutinarea pe particule inerte.* Reacția care folosește ca substrat granulele de colodiu, caolinul, latexul, polistirenul, bentonita, rășinile schimbătoare de ioni, particulele de coloranţi ş.a. pentru adsorbţia unor virusuri este pozitivă atunci cînd fenomenul de aglutinare apare în prezenţa imunoserului omolog.

3. Precipitarea. Reacţia reprezintă o formă de manifestare a reacţiei antigen — anticorp, de legare încrucişată a antigenelor solubile cu anticorpii specifici (precipitine) în prezenţa electroliţilor, avînd ca rezultat complexe insolubile care ies din soluţie şi precipită. Fenomenul este asemănător aglutinării, de care se deosebeşte prin fineţea particulelor ce sedimentează, precum şi prin marea sensibilitate a reacţiei, care poate decela antigenul chiar în diluţie de 1 la 1 milion.

a) Precipitarea în mediu lichid. Precipitarea în amestec (flocularea) se bazează pe apariţia, în întreaga masă a amestecului de ser imun şi antigen, a unui precipitat format din complexul antigen-anticorp ce sedimentează sub formă de flocoane mari, asemănătoare fulgilor de zăpadă. Metoda, depăşită, este abandonată în prezent în virusologie.

b) Precipitarea în mediu solid (difuzia). Fenomenul de difuzie în gel este comun metodelor imunochimice curente :

- imunodifuzia simplă unidimensională (ID) (Oudin, 1946) ;
- imunodifuzia radială simplă (IDRS) (Mancini şi colab., 1965) ;
- imunodifuzia dublă unidimensională (Oakley şi Fulthorpe, 1953) ;
- imunodifuzia dublă bidimensională (Ouchterlony, 1948) ;
- electroimunodifuzia (EID) (Laurell, 1966) ;
- imunoelectroforeza (Grabar şi Williams, 1953) ;
- imunoelectroforeza 9 încrucişată (Laurell, 1965) ;
- contraimunoelectroforeza (CIEF) (Bussard, 1959) ;
- electroimunoosmofereza (EIOP) (Middleton şi colab., 1976).

Aceste reacţii de precipitare se efectuează în gel de agar sau agaroză, în care se depun serul de cercetat şi antigenele virale. Orientarea godeurilor în axa unui cîmp electric îmbunătăţeşte şi grăbeşte migrarea, conform legii lui Coulomb, în care viteza de deplasare *(v)* a unui ion în cîmpul electric este direct proporţională cu sarcina electrică *(q)* a ionului respectiv şi invers proporţională cu pătratul distanţei faţă de polii sursei de curent *(D)*.

$$v = \frac{q}{D^2}$$

O condiţie pentru producerea unei reacţii de precipitare este ca fracţiunea antigenului viral standard să aibă dimensiuni moleculare suficient de reduse pentru a permite difuzia în agar. Pe de altă parte, pentru apariţia unei linii de precipitare, este necesară o cantitate optimă de molecule-imunoglobuline specifice (fiecare moleculă-antigen trebuie să se combine cu cel puţin două molecule bivalente IgG) (Luria şi Darnel, 1967), fapt ce limitează folosirea metodei la cazuri cu titruri înalte de anticorpi antivirali.

4. Neutralizarea. Bazată pe principiul stabilit de către Sternberg, care, încă din 1892, a anihilat puterea patogenă a virusului vaccinal prin punerea în contact a virusului cu imunoserul omolog, neutralizarea unui virus poate fi definită ca pierderea infectivității virale prin interacțiunea unui virus cu anticorpul specific.

a) Seroneutralizarea (reacția de neutralizare, RN). Serurile provenind de la om și animale care au trecut printr-o infecție virală sau rickettsiană conțin anticorpi neutralizanți față de virus. Aceștia joacă un rol important în apărarea naturală împotriva infecției virale, iar, pe de altă parte, prezintă un mare interes pentru imunolog și taxonomist pentru că pot diferenția și identifica tulpini foarte apropiate ale aceluiași virus, pentru epidemiolog deorece neutralizarea dintre un antigen cunoscut și anticorpi necunoscuți poate diagnostica o viroză sau, în sfîrșit, pentru cunoașterea puterii protectoare a unui ser. Reactivii amestecați *in vitro* și apoi inoculați pot continua să interacționeze și după inoculare.

Principiul reacției de neutralizare constă în punerea în contact, pentru o scurtă perioadă de timp, a agentului inframicrobian cu un ser imun omolog și inocularea ulterioară a amestecului în gazda susceptibilă (animal, ou embrionat, cultură de celule).

b) Non-neutralizarea virusurilor (rezistența la neutralizare). Fenomenul de non-neutralizare a virusurilor — descris la virusurile gripale, polio, NDV și WEE (Dulbecco și colab., 1956) — constă în imposibilitatea de a neutraliza total virusul, o parte rămînînd activ în ciuda adăugării unui exces imens de anticorpi. Rezistența la neutralizare provine din neomogenitatea anticorpilor, anomalia fiind datorată unei clase de particule care sînt, fenotipic și genetic, diferite de virusul care neutralizează rapid.

5. *Fixarea complementului.* Termenul de complement (alexină) se referă la un grup de factori serici, constituind un sistem de reacție citotoxică, a cărei activare *in vitro* de către reacții antigen — anticorp este urmată de declanșarea unor variate reacții imunologice.

a) Reacția de fixare a complementului hemolitic (RFC). Imaginată de Bordet și Gengou (citați de Cajal, 1958), reacția se realizează prin fixarea complementului pe complexul imun antigen — anticorp specific și dispariția sa din ser, pusă în evidență indirect, prin absența hemolizei sistemului hemolitic indicator — ce conține la rîndul său un antigen (hematii de berbec) și un anticorp (ser hemolitic).

b) Reacția de fixare a complementului conglutinant (conglutinarea). Utilizată în diagnosticul de laborator al febrei Q, febrei aftoase, jigodiei, limfogranulomatozei maligne, se bazează pe dispariția complementului conglutinant (factor termostabil la 60°C, capabil să aglutineze unele eritrocite sensibilizate cu un anticorp hemolitic, în prezența alexinei), indicator al formării — după adăugarea antigenului — de complexe antigen — anticorp, dovedind astfel prezența anticorpilor în serul de testat.

B. Adsorbția virusurilor pe anticorpi marcați. Am inclus în această grupă o serie de analize bazate pe adsorbția virală, cu valoare deosebită în diagnosticul de laborator al virozelor, precum și în studiul unor fenomene (atașarea, fagocitoza, pinocitoza etc.) prin imunofluorescență, greu de investigat prin alte mijloace.

1. *Anticorpi marcați cu izotopi radioactivi: radioimunoanaliza (Radioimmunoassay, RIA).* Marcarea radioactivă a anticorpilor se bazează pe înlocuirea unui atom stabil, care există în mod natural în molecula

de anticorp, cu unul radioactiv, realizată fie biosintetic (Friedberg și colab., 1955) prin introducerea unui precursor radiomarcat într-un sistem viu, fie prin marcare externă după purificarea anticorpilor. Metoda radioimunodozării în fază solidă este considerată în prezent a fi de generația a treia de sensibilitate și se aplică în special în diagnosticul de laborator al hepatitei virale.

Adsorbția virusului se face după principiul „sandwich" (anticorp — antigen — anticorp marcat) realizat, în fază solidă, între anticorpii de cobai (fixați în prealabil pe perle de polistiren), AgHBs (din serul sau plasma de cercetat) și anticorpi umani marcați radioactiv cu ^{125}I. Diagnosticul se pune radiometric, radioactivitatea finală fiind direct proporțională cu cantitatea de AgHBs cuplată cu anticorpii marcați.

Dimpotrivă, detecția anticorpilor față de virusul hepatitei A sau față de AgHBc se face pe principiul *competitivității* dintre anticorpii marcați și anticorpii din ser ; cu cît va fi mai scăzută radioactivitatea probelor, cu atît va fi mai mare cantitatea anticorpilor specifici.

2. *Anticorpi marcați cu enzime : dozarea imunoenzimatică (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA).* În principiu, orice enzimă poate fi detectată prin metode histochimice, însă pentru marcarea enzimatică au fost selecționate doar oxidoreductazele (peroxidaza din hrean — sigma tip VI — și glicooxidaza), fosfatazele (fosfataza alcalină și fosfataza acidă) și tripsina (Avrameas, 1972). Pentru cuplarea acestor enzime cu proteina-anticorp se folosesc în prezent ca agenți de legătură clorura acidului cianhidric și, mai ales, glutaraldehida. În final, se realizează cuplarea anticorpilor din imunoseruri cu enzima și decelarea antigenelor omoloage puse în reacție, ori a celor din celulele imunocompetente sau, dimpotrivă, adsorbția moleculei marcate de imunoglobulină specifică din serul de testat cu antigenul viral standard (Abelson și colab., 1969).

3. *Anticorpi marcați cu fluorocrom : imunofluorescența (IF).* Fluorescența, proprietatea unei substanțe de a emite radiații luminoase, atunci cînd aceasta este excitată fotonic în anumite condiții, este emisiunea de lumină de o anumită culoare a unei substanțe, atunci cînd este iradiată cu o lumină de altă culoare. Din spectrul larg electromagnetic, fluorescența este cuprinsă între $5 \times 10^{-3} - 10^{30}$ Å.

Substanțele fluorescente, fluorocromii (dintre aceștia cel mai utilizat fiind izotiocianatul de fluoresceină), sînt substanțe organice care emit o fluorescență caracteristică în urma iradierii lor în spectrul ultraviolet sau vizibil, comportamentul optic fiind determinat de capacitatea lor de disociere electrolitică.

Principiul reacției se bazează pe vizualizarea microscopică a reacției antigen-anticorp, realizată prin adsorbția antigenului necunoscut pe anticorpii marcați. Cuplarea fluorocromilor cu proteinele-anticorp (conjugatul marcat) se obține prin intermediul grupărilor aminice, carboxilice, fenolică sau amino-, urmată de purificarea prin dializă, precipitare, adsorbție pe pulbere de cărbune activ și filtrare prin gel de Sephadex sau pe coloane schimbătoare de ioni. În final, trebuie diferențiată imunofluorescența specifică investigată de autofluorescență — fluorescența nespecifică —, proprie țesuturilor.

4. *Anticorpi marcați cu feritină: analiza imunomorfologică (imunoelectronomicroscopia).* Marcarea electronoopacă a anticorpilor în vederea localizării celulare a unor antigene virale are în vedere mărirea rezoluției microscopice pînă la dimensiuni moleculare. Fierul, folosit sub formă de feritină — proteină extrasă din splină, ficat sau alte organe —, de formă sferică, cu diametrul de 105—120 Å și greutatea moleculară de aproximativ 460 000 daltoni, are o concentrație de 2 000—3 000 de atomi de fier *per* moleculă de feritină, fapt ce îi conferă o densitate electronică mare.

După cuplarea imunoglobulinelor cu feritină și purificarea conjugatului marcat, se realizează adsorbția printr-o reacție imună antigen-anticorp și se poate observa electronooptic preparatul.

5. *Anticorpi marcați cu feritină și fluorocrom: anticorpi dublu-marcați.* Localizarea reacției antigen — anticorp în structura fină a țesuturilor — decelată cu ajutorul tehnicii cu imunoferitină și a microscopului electronic —, fiind adesea greu de interceptat, se recomandă efectuarea unor investigații de imunofluorescență care să preceadă experimental la nivelul microscopului electronic. Dubla marcare nu influențează negativ activitatea specifică a imunoglobulinelor.

Adsorbția anticorpilor antivirali pe antigene bacteriene. *Seroreacția Weil-Felix.* Datînd din 1916, seroreacția, denumită astfel după numele autorilor ei, se bazează pe aglutinarea unor tulpini ale bacilului *Proteus,* în special tulpina X 19, de către serul bolnavilor de tifos exantematic. Este utilizată în diagnosticul acestei rickettsioze, precum și al pneumoniei atipice, trahomului și limfogranulomatozei benigne (Cajal, 1958).

Adsorbția hematiilor pe anticorpi antivirali. Reacții serologice pun în evidență anticorpi care apar în cursul unor boli, dar care nu sînt specifici pentru boala respectivă. De pildă, reacția Paul-Bunnell evidențiază anticorpi heterogeni în mononucleoza infecțioasă iar testul aglutininelor la rece — în pneumonia atipică cu mycoplasme.

Reacția de hemaglutinare Paul-Bunnell-Davidsohn. Diferită de reacția Hirst, cunoscută și sub numele de reacția Hăngănuțiu-Paul-Bunnell-Davidsohn, reacția se bazează pe punerea în evidență în serul bolnavilor a unor aglutinine antioaie, care prezintă în același timp particularitatea de a putea fi adsorbite pe extract de hematii de bou, fără a putea fi însă adsorbite pe extractul de rinichi de cobai. Tehnica comportă două faze:

— *testul prezumtiv Paul-Bunnell,* cantitativ, evidențiază aglutininele antioaie;

— *testul diferențial Davidsohn-Paul-Bunnell,* calitativ, identifică aglutinina prin adsorbție comparativă, stabilind diagnosticul cert de mononucleoză infecțioasă.

Din 1968, cînd s-a descoperit asociația cauzală dintre virusul Epstein-Barr și mononucleoza infecțioasă, reacția Paul-Bunnell-Davidsohn (la care anticorpii heterofili constituiau singura cale de diagnostic) este tot mai puțin utilizată. Testul cu hemolizina bovină este mai specific, dar mai puțin sensibil, testul de imunoaderență are o sensibilitate mai înaltă (Lenette, 1978), iar trusele apărute recent, folosind aglutinarea pe lamă a celulelor de cal formolate, sînt de cea mai apropiată perspectivă.

Aglutinarea la rece (izoaglutinarea, autoaglutinarea). Reacţia are ca scop punerea în evidenţă în serul sanguin a unor aglutinine care aglutinează hematiile umane proprii sau cele de grup 0, numai la temperaturi joase (4°C); aceste aglutinine, total diferite de hemaglutininele care intervin în reacţia Hirst — crioaglutininele — semnalate încă din 1930 de Landsteiner, au fost implicate de Turner şi colab. (1943) în etiologia pneumopatiilor atipice şi, ulterior, în unele pneumonii inframicrobiene (Cajal, 1964).

Reacţia se execută, comparativ, în două variante: cu hematii provenind de la bolnavul de cercetat *(autoaglutinarea)* şi cu hematii recoltate de la un donator universal, grup 0 *(izoaglutinarea),* pentru eliminarea oricăror posibilităţi de eroare.

Adsorbţia hematiilor pe celule infectate cu virusuri. *Hemadsorbţia (HAd).* Fenomen adaptat de Shelokov şi colab. (1958) la metodologia de diagnostic virusologic, hemadsorbţia a devenit un procedeu de determinare directă a prezenţei şi replicării unui virus, în absenţa unui efect citopatic (Enders, 1954). Acest test se bazează pe capacitatea celulelor care au permis cultivarea virusurilor de a adsorbi la suprafaţa lor hematiile dintr-o suspensie care se adaugă în tubul de cultură. Metoda este utilă în cazul virusurilor a căror prezenţă este greu de stabilit direct — deoarece nu induc efect citopatic vizibil la microscop —, dar care, fiind hemaglutinante (spre exemplu, virusurile gripale, Newcastle, Sendai şi encefalomiocardic), ar putea fi identificate indirect prin reacţia de hemaglutinare şi confirmate specific prin hemaglutinoinhibare.

Hemadsorbţia este considerată pozitivă cînd hematiile (de cobai, iepure, oaie, *Macacus rhesus* sau umane de grup 0) adăugate la cultura de celule infectate sînt adsorbite la suprafaţa acestora, apărînd, după 40—100 de ore de contact, sub forma de aglutinări de hematii în grămezi, rozete ovale sau alungite, ori în lanţuri situate de-a lungul unor linii de clivaj ale celulelor din cultură. În stadii avansate, cînd hemadsorbţia este totală, hematiile tapisează stratul de celule, iar cele în exces plutesc sub formă de grămezi (Aderca, 1962). Specificitatea reacţiei se verifică cu ser imun, în prezenţa căruia hemadsorbţia nu se mai produce pentru virusul omolog, hematiile plutind libere în mediu, de data aceasta neadsorbite.

Hemadsorbţia mixtă. Este un test de evidenţiere a anticorpilor antivirali, prin care peste o cultură în monostrat infectată cu un anumit virus se aplică serul de testat şi, după inoculare şi spălare, se adaugă eritrocite învelite cu anticorpi antiglobulină umană. În cazul în care serul de testat conţine anticorpi faţă de virusul infectant, globulinele-anticorp se fixează pe monostratul de celule infectate; ulterior, eritrocitele adăugate se vor fixa — cu ajutorul anticorpilor antiglobulinici ce le învelesc — pe monostratul de celule infectate şi tratate cu serul de testat. Agregatele „celule infectate + hematii" care se formează atestă prezenţa anticorpilor antivirali în serul de testat (Boroş şi colab., 1981).

Reacţia de inhibare a hemadsorbţiei (HAdI). Principiul reacţiei se bazează pe proprietatea serului imun de a împiedica adsorbția eritrocitelor într-o cultură celulară contaminată cu un virus hemadsorbant. Reacția, de altfel foarte utilă în cazul identificării unor virusuri hemadsorbante, nu a intrat în uzul curent pentru diagnosticul serologic al virozelor, deoarece prezintă inconvenientul de a nu permite un control cantitativ strict al virusului standard (Voiculescu și Mihancea, 1982).

Adsorbția virusurilor pe celula-gazdă. Pentru a obține acces la structura complicată a citoplasmei care adăpostește echipamentul enzimatic al celulei-gazdă, virusul trebuie mai întîi să vină în contact cu celula. Una dintre particularitățile virusurilor — specificitatea pentru anumite gazde — este în primul rînd o specificitate de fixare, datorită interacțiunii dintre o serie de constituenți biochimici normali ai suprafeței celulei-gazdă (a căror prezență determină, în mare măsură, fixarea, deoarece acționează ca receptori specifici de virus) și unele structuri speciale situate pe suprafața virusurilor, răspunzătoare de recunoașterea receptorilor celulari.

Există două mecanisme distincte prin care se stabilește contactul virus — celulă-gazdă :

— primul grup cuprinde virusul vaccinal, virusurile ectromeliei, psittacozei ș.a., care sînt capabile să se replice într-o serie largă de celule epiteliale, contactul lor putînd fi vizualizat ca o coliziune întîmplătoare. La aceste virusuri nu există nici o probă pentru prezența la suprafața lor a unui mecanism asigurînd un contact strîns și selecționat cu suprafața celulei-gazdă ;

— cel de-al doilea grup, incluzînd bacteriofagii, virusurile gripale, urliene, NDV ș.a. și-a dezvoltat un receptor elaborat, adecvat la suprafața celulei-gazdă.

A. Adsorbția virusurilor pe celule procariote. Celulele procariote, cele mai simple forme de viață, apărute în urmă cu peste două miliarde de ani, cînd *Terra* era în formare, într-un mediu ostil vieții (atmosferă toxică și anaerobă, radiații ultraviolete neecranate, radioactivitate extrem de intensă, descărcări electrice puternice și frecvente), sînt celule cu perete celular și membrană plasmatică internă, fără aparate citoplasmatice specializate, fără nucleu, cromozomi etc., fapt ce le-a conferit o stabilitate deosebită.

Adsorbția fagilor pe bacterii. Încă din 1932, Schlessinger a atras atenția că mișcările browniene ale bacteriei și fagului sînt singurul agent răspunzător de coliziunea lor atunci cînd adsorbția fagului este de ordinul 5×10^{-11} cm^3/s. *Escherichia coli,* ca majoritatea bacteriilor, posedă o încărcătură electrică negativă puternică de suprafață, așa cum arată migrarea sa electroforetică, precum și aglutinarea și precipitatea sa cînd pH-ul soluției este scăzut ; numărul situsurilor negative este estimat la aproximativ 3×10^7 grupe negative pe suprafața celulară, ceea ce înseamnă un grup carboxil la fiecare 100 Å^2.

Unirea inițială a fagului cu gazda poate apărea prin formarea unei punți covalente, prin stabilirea lanțurilor S-S între două corpuri sau prin interacțiuni electrostatice implicînd forțe ionice multipolare, legături de hidrogen și forțe Van der Waals.

În contrast cu celulele eucariote, bacteriofagii permit adsorbția numai la schimbători de ioni încărcați negativ, cu condiția să existe în mediu o cantitate suficientă de ioni anorganici de Ca^{2+} și, în special, Zn^{2+} (dar nu Mg^{2+} și, cu atît mai puțin, Na^{+}), cationii bivalenți putînd forma punți care leagă o încărcătură electrică negativă cu alta de pe suprafața fiecărui corp, fag — bacterie.

Atașarea este reversibilă la temperaturi joase, însă fără omorîrea bacteriei, și este ireversibilă cînd se realizează la temperaturi înalte. Forța de atracție a fagului de bacterie este fantastic de mare, și anume de 10^{-5} dyn/virus, adică de 10 milioane de ori mai mare decît forța dezvoltată în ultracentrifugă la 50 000 *g* și care este de „numai“ 10^{-12} dyn/virus (Pollard, 1953).

Tehnica de adsorbție — eluție a fagilor pe bacterii a găsit aplicații în domeniul geneticii bacteriofagului, prin adsorbția lizatului tulpinilor-gazdă bacteriene infectate cu fagi (spre exemplu fagul T5 — *Escherichia coli*) (Wessermann, 1958).

B. *Adsorbția virusurilor pe celule eucariote.* Celulele eucariote, apărute cu 1,8 miliarde de ani în urmă, în condiții aerobe, sînt celule cu secvență nucleică convertibilă în structuri diferențiate și funcții specializate.

Există două tipuri fundamentale și un tip mixt de relații virus — celule eucariote :

— *relații de tip citocid sau litic*, cărora le sînt proprii complexe virus — celulă independente, cînd are loc o disjuncție între activitățile genomului viral și a celui celular ; în acest tip de relație infecția celulei cu virus se soldează totdeauna cu moartea celulei parazitate, odată cu producerea de noi progeni virali ;

— *relații de tip simbiotic sau transformant*, la care apar complexe virus — celulă dependente, cînd genomul viral se ancorează pe genomul celular, replicîndu-se concomitent și conferind celulei proprietăți noi ; celula se transformă, apărînd modificări de cariotip, modificări morfologice, schimbări ale configurației situsurilor de suprafață ;

— *relații de tip mixt* (citocid și simbiotic), cu predominanța relațiilor simbiotice, produse în țesuturile mamiferelor de către virusurile latente, putînd realiza atît complexe virus — celulă independente, cît și dependente ; apar astfel infecții persistente ale unor culturi celulare fără distrugerea substratului celular sau, pe de altă parte, unele virusuri latente sînt integrate în genomul celulei-gazdă, fără a induce „transformarea“ (Voiculescu și Mihancea, 1982).

Fazele adsorbției virusurilor. Procesul de adsorbție a virusurilor pe celula-gazdă eucariotă, indiferent de categoria de relații în care se include, are loc în doi timpi : coliziunea și atașarea.

a) Coliziunea. Reprezintă alipirea virionului de suprafața celulei sensibile. Ea depinde, pe de o parte, de proporția între numărul de particule virale și numărul de celule (indicele de infectivitate sau multiplicitatea infecției), iar, pe de altă parte, de unele condiții de mediu (pH, concentrație ionică) și de temperatură.

b) Atașarea. Este timpul important al adsorbției și traduce unirea strînsă între virioni și unele zone de pe suprafața celulei (receptori).

Receptorii de virus sînt constituenţi normali ai suprafeţelor celulare, care prezintă o configuraţie structurală pentru care virusurile au o mare afinitate, datorită căreia, în condiţii fiziologice, se leagă în mod specific; specificitatea lor este conferită, după caz, de o parte a unei micromolecule sau de porţiuni din mai multe molecule. Natura receptorilor celulari şi a constituenţilor virali care interacţionează cu ei variază pentru fiecare tip de virus. Pentru myxovirusuri, situsul iniţial de interacţiune pe suprafaţa celulară este reprezentat de o substanţă mucoidă glicoproteică care conţine resturi de acid neuraminic (acid sialic), contactul virus — celulă fiind stabilit prin intermediul hemaglutininelor superficiale. Pentru adenovirusuri, receptorul celular este reprezentat de un polipeptid aflat în tonofibrile, cu greutatea moleculară de 78 000 daltoni, şi dintr-o proteină auxiliară, cu greutatea moleculară de 42 000 daltoni. Poxvirusurile se leagă de membrana celulară prin intermediul structurilor tubulare de pe suprafaţa lor.

Adsorbţia virusurilor pe celule este facilitată de numărul mare al receptorilor de virus; astfel, celulele KB au fiecare aproximativ 10 000 de receptori pentru adenovirusul 2, iar unele celule animale au chiar pînă la 100 000 de receptori pentru virusul paragripal Sendai. În plus, morfologia virusului, aşezarea simetrică radială a „spiculilor" glicoproteici pe suprafaţa învelişurilor virale, ca şi arhitectura icosaedrică a multor virusuri asigură corpusculilor virali multiple puncte de fixare pe situsuri echivalente, în cursul interacţiunii cu receptorii celulari (Dales, 1978).

Receptorii pot fi nespecifici, ca în cazul virusurilor care se propagă neselectiv pe mai multe tipuri de celule (arbovirusuri, poxvirusuri), sau, dimpotrivă, receptorii celulari pot fi specifici pentru anumite tipuri de virusuri, ceea ce explică tropismul unor agenţi virali faţă de unele substraturi celulare (myxovirusuri, picornavirusuri). Astfel, spre exemplu, virusurile gripale sînt receptate de celulele tractului respirator, virusul rabic — care deşi are ca poartă de intrare tegumentul şi mucoasele — prezintă un tropism pentru celulele sistemului nervos, iar virusul poliomielitic — un enterovirus — se adsoarbe numai pe celulele intestinale şi ale sistemului nervos central de om şi maimuţă, celelalte tipuri de celule umane sau de maimuţă fiind infectate numai după cultivarea lor *in vitro*, procedeu prin care se realizează „demascarea" receptorilor celulari.

Interferenţa de adsorbţie. Interferenţa virală este o stare de rezistenţă parţială sau completă a celulei, ţesutului sau organismului, indusă de un virus inductor, faţă de infecţia cu alt virus infectant.

Interferenţa de adsorbţie este o interferenţă de ataşare, ca rezultat al alterării sau distrugerii receptorilor celulari specifici pentru unul din cele două virusuri, fapt care duce la imposibilitatea de adsorbţie şi penetrare în celulă a virusului infectant. Este posibil ca interferenţa să apară ca urmare a blocării receptorilor celulari — specifici fiecărui tip antigenic — de către materialul capsidal rezidual; procesul este reversibil la pH acid datorită disocierii atît a capsidelor, cît şi a receptorilor celulari.

Interferența de adsorbție apare în cazul reinfecției cu un virus omolog (spre exemplu, celule HeLa infectate cu doze mari de poliovirus și apoi reinfectate cu același virus) sau, dimpotrivă, cu un virus heterolog (celule de pasăre infectate cu virusul sarcomului Rous nu pot fi infectate ulterior cu virusul leucozei aviare). Neuraminidaza virusului gripal inactivat prin radiații ultraviolete sau căldură distruge receptorii celulari pentru virusurile gripale vii, atît omoloage, cît și heteroloage (Voiculescu și Mihancea, 1982).

4.2.1.11. *Radiațiile*

Radiațiile sînt fascicule de particule în a căror interacțiuni cu substanța se manifestă în special aspectele lor corpusculare. Ne referim nu numai la particulele elementare cu masa de repaus diferită de zero (electroni, protoni, neutroni) sau nulă (fotoni, neutrino etc.), ci și la particulele compuse, nuclee ușoare (deuteron, particula alfa etc.).

În procesele de interacțiune cu atomii (moleculele) substanței prin ciocniri elastice sau neelastice, particulele se comportă ca niște corpusculi caracterizați de o anumită valoare a impulsului și energiei.

În sens mai restrictiv, prin radiații se înțeleg fascicule de fotoni; funcție de lungimea lor de undă (λ) (tabelul 4-II), cu alte cuvinte de intervalele lor de frecvență, undele electromagnetice asociate fotonilor pot fi clasificate conform tabelului 4-II.

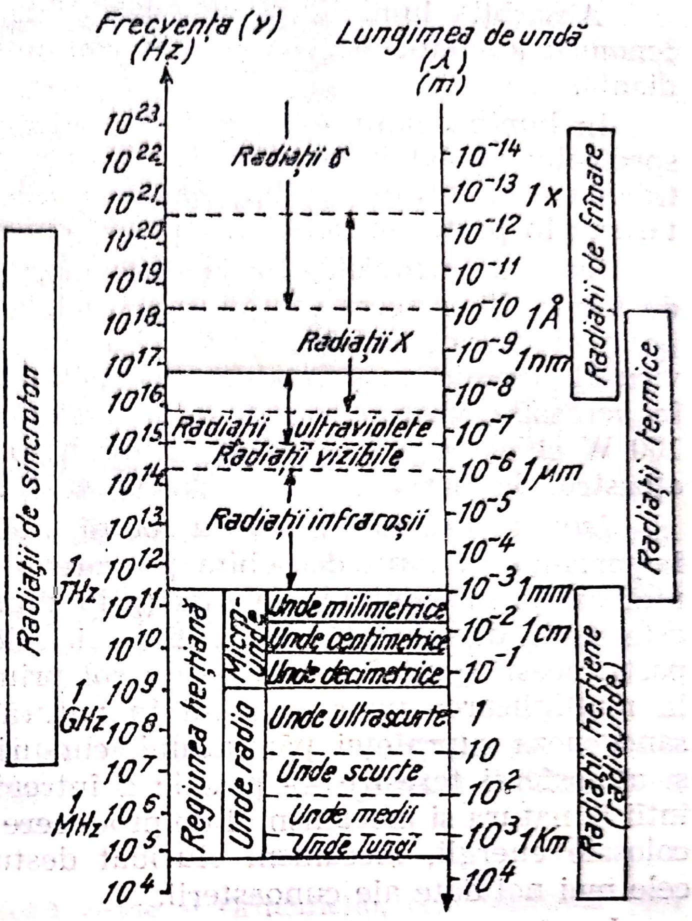
TABELUL 4-II

Scara de radiații și lungimile de undă

Radiația	Lungimea de undă
Radiații cosmice	0,1 X = 0,001 Å
Radiații gamma	0,1 X — 1 X = 0,001 — 0,01 Å
Radiații X	0,004 nm — 15 nm = 0,04 — 150 Å
Radiații ultraviolete	5 nm — 0,38 μm = 50 — 3 800 Å
Lumina vizibilă	0,38 μm — 0,76 μm = 3 800 — 7 600 Å
Radiații infraroșii	0,76 μm — 343 μm = 7 600 Å — 0,343 mm
Unde herziene (mm și cm)	0,1 mm — 10 cm
Unde herziene radio	1 dm — 15 km
Oscilații încete (generatori)	15 km — 6 000 km

Este interesant de remarcat că undele electromagnetice cu lungimea de undă mai mică de 10^2—10^3 Å sînt specifice radiațiilor ionizante, pe cînd cele mai mari de 10^3 Å sînt caracteristice radiațiilor neionizante, spectrul vizibil situîndu-se în apropierea pragului dintre cele două (10^4 Å) (fig. 4-6 și fig. 4-7).

Fig. 4-6 — Clasificarea undelor (radiațiilor) electromagnetice în raport cu frecvența (ν) și lungimea de undă (λ) (după Gherbanovski și colab., 1982).


Frecvența (ν) (Hz)
Lungimea de undă (λ) (m)
10^{23}
10^{22}
10^{21}
10^{20}
10^{19}
10^{18}
10^{17}
10^{16}
10^{15}
10^{14}
10^{13}
10^{12}
1 THz
10^{11}
10^{10}
1 GHz
10^{9}
10^{8}
10^{7}
1 MHz
10^{6}
10^{5}
10^{4}
Radiații γ
Radiații X
Radiații ultraviolete
Radiații vizibile
Radiații infraroșii
Unde milimetrice
Unde centimetrice
Unde decimetrice
Micro-unde
Unde ultrascurte
Unde scurte
Unde medii
Unde lungi
Unde radio
Regiunea herțiană
Radiații de sincrotron
10^{-14}
10^{-13} 1 X
10^{-12}
10^{-11}
10^{-10} 1 Å
10^{-9} 1 nm
10^{-8}
10^{-7}
10^{-6} 1 μm
10^{-5}
10^{-4}
10^{-3} 1 mm
10^{-2} 1 cm
10^{-1}
1
10
10^{2}
10^{3} 1 Km
10^{4}
Radiații de frînare
Radiații termice
Radiații herțiene (radiounde)

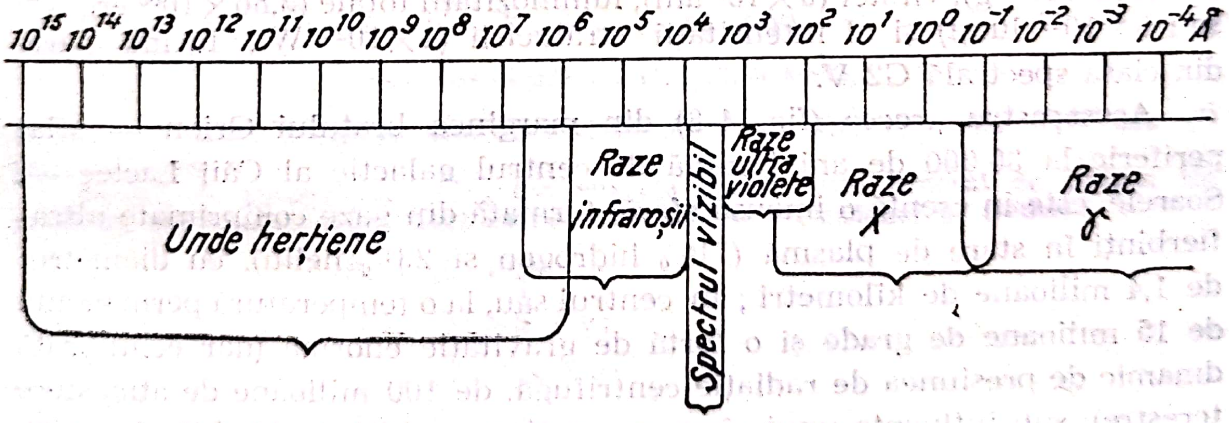

10^{15} 10^{14} 10^{13} 10^{12} 10^{11} 10^{10} 10^{9} 10^{8} 10^{7} 10^{6} 10^{5} 10^{4} 10^{3} 10^{2} 10^{1} 10^{0} 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} Å
Unde herțiene
Raze infraroșii
Spectrul vizibil
Raze ultraviolete
Raze X
Raze γ

Fig. 4-7 — Gama undelor electromagnetice, în care lungimea de undă (λ) este exprimată în Å (după Bainglass, 1956).

Radiațiile neionizante. *Radiația luminoasă (lumina vizibilă).* Fenomen ondulator cu caracter cuantic, rezultantă a unui grup de șapte culori cu lungimi de undă diferite, radiația luminoasă este o emisiune de fotoni ce se produce ca expresie a oscilațiilor electronilor din atomi. Energia fotonilor *(E)* este direct proporțională cu frecvența radiației luminoase (ν) și deci invers proporțională cu lungimea de undă.

Absorbţia luminii, pe de altă parte, se produce pe baza aceluiaşi fenomen (oscilaţii ale electronilor din atomi), cu preluare de energie radiantă.

În lumina naturală, aşa-numita „lumină albă“, în afara radiaţiilor spectrului vizibil intră şi radiaţiile care nu impresionează retina — ultraviolete şi infraroşii ; lumina din care lipsesc radiaţiile infraroşii, total sau în parte, se numeşte în mod curent „lumină rece“.

Lumina artificială. Produsă de becuri cu filament incandescent ori de tuburi fluorescente, lumina artificială pare a nu avea influenţă asupra virusurilor ; astfel, expus la lumina unui bec cu o putere de 400 W, virusul rujeolic nu-şi modifică capacitatea infectantă în 3 min, dispersat în aerosoli ; virusul pestei suine rezistă 60 min la lumina becului de 100 W chiar în prezenţa unui colorant puternic fotoinactivant, cum este albastrul de metilen.

Lumina naturală (radiaţia solară, radiaţia vizibilă). Avînd în vedere importanţa cu totul deosebită pe care o are acest agent fizic în domeniul expus în capitolul de faţă (prin faptul că viaţa pe planeta Pămînt este total dependentă de lumina şi căldura solară şi că, pe de altă parte, acest agent fizic deţine un rol primordial la scara întregii planete în multiplicarea unor germeni în natură cît şi în sterilizarea virală şi sanogeneza suprafeţei pămîntului, cursurilor de apă, oceanului planetar şi atmosferei terestre — practic a întregii ecosfere), ne vom referi mai întîi la natura şi mecanismul de producere extrem de complexe ale acestei colosale energii, mecanism elucidat destul de recent şi prezentat după cele mai noi date ale cunoaşterii.

Lumina naturală, la care este expusă permanent *Terra*, este emisă de o stea stabilă, medie din punct de vedere al mărimii (raza$=6{,}9\times10^{8}$ m), masei (2×10^{33} g), vîrstei (5×10^{9} ani), luminozităţii totale ($3{,}86\times10^{33}$ erg$\cdot$s^{-1} sau 3×10^{27} lucşi) şi al intensităţii strălucirii (4×10^{26} W), făcînd parte din clasa spectrală G2 V.

Acest astru „rece“ (fig. 4-8) din marginea braţului Orion — aflat periferic la 30 000 de ani lumină de centrul galactic al Căii Lactee —, Soarele, este în esenţă o imensă sferă, formată din gaze comprimate ultrafierbinţi în stare de plasmă (71% hidrogen şi 28% heliu), cu diametrul de 1,4 milioane de kilometri ; în centrul său, la o temperatură permanentă de 15 milioane de grade şi o forţă de gravitaţie enormă (dar echilibrată dinamic de presiunea de radiaţie centrifugă, de 100 milioane de atmosfere terestre), sub influenţa unui cîmp magnetic torroidal de 10^{-4} T (fig. 4-9), are loc o reacţie termonucleară autoreglată, în regim constant, neajungînd deci la reacţia în lanţ şi la explozie.

În cadrul acestei reacţii, nucleele uşoare de hidrogen (H) — protonii —, prin coliziuni violente la viteze enorme, reuşesc să învingă bariera de respingere electrostatică dintre ei şi să se apropie la distanţe de 100 000 de ori mai mici, contopindu-se într-un nucleu de hidrogen mai greu, cu doi protoni (deuteriu) şi în final 4 protoni (heliu). Prin fuziunea şi conversia lor în heliu (He) într-un ritm de 10^{38} astfel de fu-

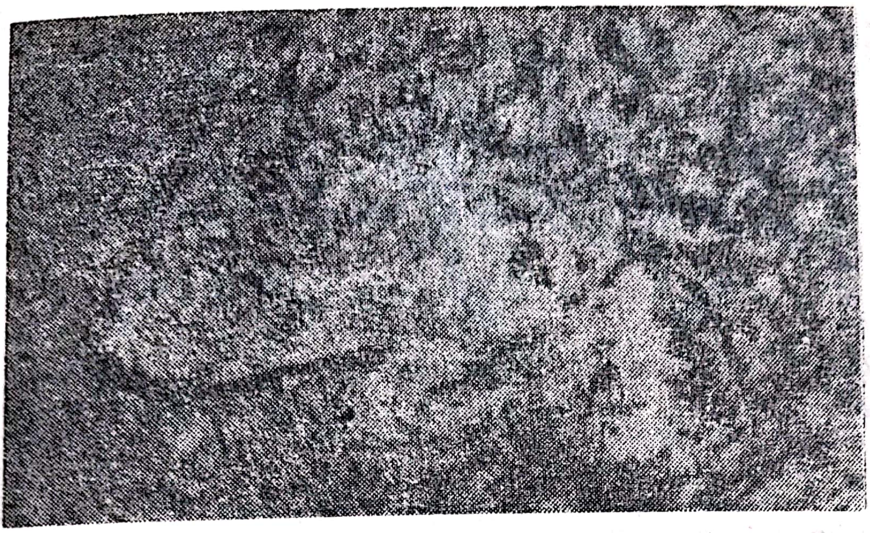


Fig. 4-8 — Detaliu al discului solar, care emite un flux continuu și constant de radiații electromagnetice de mare intensitate (cu energia de $3{,}8 \times 10^{26}$ J la suprafața soarelui), în care intră și lumina (corpuscul și undă, ocupînd banda de frecvențe cuprinsă între $3{,}75 \times 10^{16}$ s^{-1} și $7{,}50 \times 10^{16}$ s^{-1}).

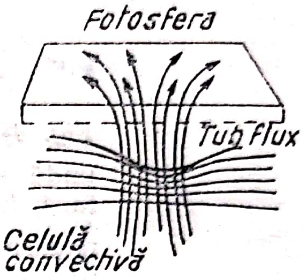


Fig. 4-9 — Modelul Babcock-Leighton al cîmpului magnetic solar (după Țifrea și colab., 1987).

ziuni/s, $6{,}4 \times 10^{11}$ kg de hidrogen se transformă în heliu* în fiecare secundă, rezervele actuale de hidrogen fiind suficiente pentru desfășurarea acestui proces încă 5 miliarde de ani.

---

* Prin reacția proton-proton (după Bethe și Critchfield), este furnizată 90% din energia solară :

$$^{1}_{1}H + ^{1}_{1}H \rightarrow ^{2}_{1}H + ^{0}_{1}e + \nu ;\ (2{,}36\ MeV),$$

$$^{2}_{1}H + ^{1}_{1}H \rightarrow ^{3}_{2}He + \gamma ;\ (10{,}98\ MeV),$$

$$^{3}_{2}He + ^{3}_{2}He \rightarrow ^{4}_{2}He + 2^{1}_{1}H ;\ (12{,}86\ MeV),$$

$^{1}_{1}H$ sau $^{1}_{1}p$ fiind protonul din nucleul atomului de hidrogen, iar $^{2}_{1}H$ sau $^{2}_{1}D$ fiind deuteriul.

Restul, de aproximativ 10% din energia solară, este generat de sinteza He printr-un alt proces, prin 'ciclul carbon-azot (după Weizsäcker și Bethe) :

$$^{1}_{1}H + ^{12}_{6}C \rightarrow ^{13}_{7}N + \gamma ;$$

$$^{13}_{7}N \rightarrow ^{13}_{6}C + ^{0}_{1}e + \gamma ;$$

$$^{13}_{6}C + ^{1}_{1}H \rightarrow ^{14}_{7}N + \gamma ;$$

$$^{14}_{7}N + ^{1}_{1}H \rightarrow ^{15}_{8}O + \gamma$$

$$^{15}_{8}O \rightarrow ^{15}_{7}N + ^{0}_{1}e + \nu ;$$

$$^{15}_{7}N + ^{1}_{1}H \rightarrow ^{12}_{6}C + ^{4}_{2}He,$$

În final, ΔE, energia rezultată din fuziunea a 4 nuclee de H este de ordinul :

$$\Delta E = \Delta mc^2 = (4m_{^{1}_{1}H} - m_{^{4}_{2}He})c^2 = 26{,}73\ MeV = 4 \times 10^{-12} J,$$

în care : m=masa nucleului atomic al elementului ; c=viteza luminii ; ν=neutrino ; γ=radiația gamma.

La fuziunea unui singur kilogram de hidrogen și la sinteza lui în heliu se eliberează $6{,}25 \times 10^{14}$ J.

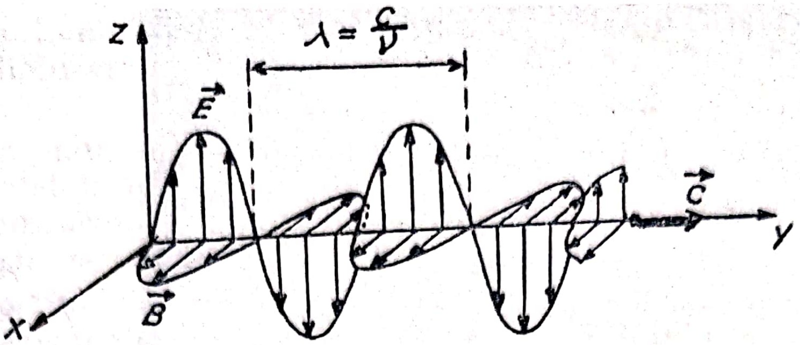


Fig. 4-10 — În fiecare punct al spaţiului atins de o undă electromagnetică, vectorii $\vec{E}$ şi $\vec{B}$ oscilează în fază, în direcţii normale Ox, Oz pe direcţia de propagare Oy. Ansamblul $\vec{E}$, $\vec{B}$ formează o undă electromagnetică transversală care se propagă în vid cu viteza c a luminii (după Gherbanovski şi colab., 1982).

Radiaţia emisă de întreaga materie solară este de $3{,}826 \times 10^{33}$ erg·s^{-1}, colosala energie produsă de plasma fierbinte dar întunecată din nucleul Soarelui servind în principal la întreţinerea permanentă a procesului termonuclear, iar excedentul de energie fiind eliberat prin convecţie sub formă de căldură şi de radiaţii electromagnetice (fig. 4-10) cu spectru foarte larg [radiaţii X şi UV (8%), vizibile (41%) şi infraroşii (51%), precum şi particule ionizante de mare energie].

Densitatea mare a plasmei din nucleul solar (hidrogenul fiind aici de 12 ori mai dens decît plumbul), precum şi recombinarea electronilor cu protonii şi particulele α în cadrul sintezei heliului fac ca Soarele să fie opac, întunecat, la nivel central.

Transportul energiei solare pe verticală (fig. 4-11), din nucleu spre suprafaţa astrului, se face prin fotoni — cuante* de lumină — a căror energie E este egală cu :

$$E = h \cdot \nu$$

în care h = constanta lui Planck ($6{,}625 \times 10^{-27}$ erg·s), iar ν = frecvenţa undei electromagnetice.

Aceste cuante de energie, fotonii, provoacă turbulenţa din zona convectivă (vezi fig. 4-9) prin unde acustice şi unde de şoc gigantice, care le facilitează penetrarea spre exterior. În drumul lor (vezi fig. 4-11), din globul solar spre suprafaţa astrului, fotonii — suferind o serie de absorbţii, reemisii şi difuzii, pierzînd astfel continuu cuante din energia lor iniţială — se transformă pe parcurs, din radiaţii γ în radiaţii X, de-

---

* Unitatea unei mărimi fizice, care poate lua doar valori egale cu multiplii întregi ai acestei unităţi ; este o unitate structurală de bază a cîmpurilor, aşa cum este fotonul pentru cîmpul electromagnetic.

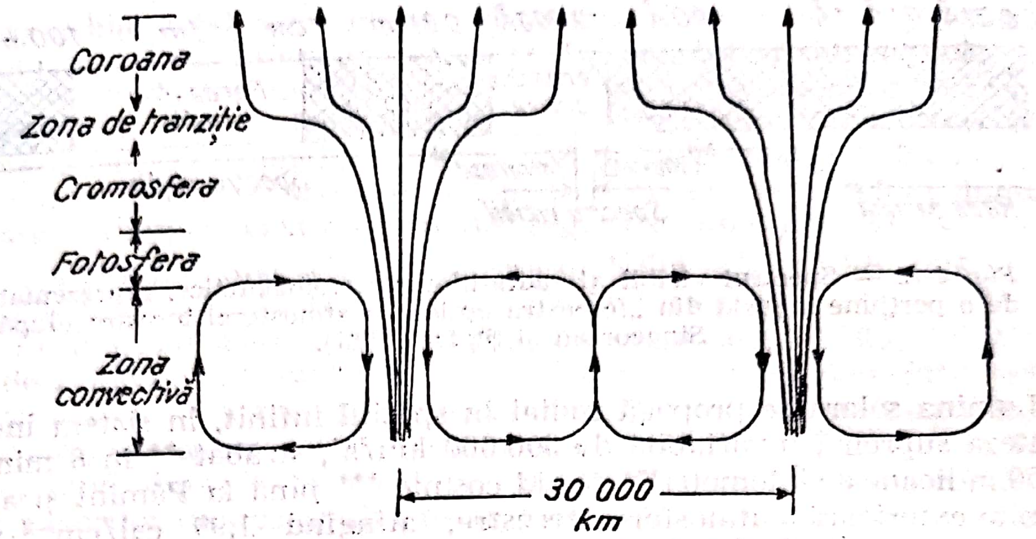


Fig. 4-11 — Reprezentarea schematică a modelului superangular, în cadrul căruia fotonii eliberați din nucleul solar străbat zona convectivă, fotosfera și atmosfera solară, răspîndindu-se apoi în Univers (după Țifrea și colab., 1987).

generează apoi în radiații UV și în final, la nivelul fotosferei, în lumină. Datorită ionilor negativi de hidrogen, fotosfera are opacitate foarte mică, permițînd emisia luminii vizibile* (vezi fig. 4-11), care penetrează atmosfera solară (cromosfera** și coroana***), răspîndindu-se în Univers cu viteza de eliberare (V_e^2) din discul solar, egală cu viteza luminii, conform relației :

$$V_e^2 = \frac{2G \cdot M}{r}$$

în care G = gravitația, M = masa Soarelui, iar r = raza acestuia (Țifrea și colab., 1987).

---

* Ochiul uman și al celorlalte viețuitoare s-a adaptat la lumină, astfel că percepe undele electromagnetice cu lungimea de undă $\lambda = 7\,600—4\,000$ Å, maximum de sensibilitate al ochiului fiind în jurul lui $\lambda = 5\,700$ Å, iar al plăcii fotografice $\lambda = 4\,500$ Å.

** Strat al atmosferei solare în permanentă stare de agitație datorită undelor de șoc acustice, care o aduc la temperatura de 1 milion°K.

*** Strat rarefiat (10^{-9} g/cm^3) și transparent, cel mai exterior, mai vast (egal cu 10—14 raze solare) și mai fierbinte (2 milioane°K) al atmosferei solare. Coroana generează și „vîntul solar" — flux de radiații corpusculare, de particule electrizate, protoni și electroni, provenind în special din hidrogen ionizat — ce se deplasează în spațiu, ca efect al presiunii termice, cu viteza de 300—900 km/s. Acest curent de particule este considerat, în concepția modernă, ca reprezentînd expansiunea coroanei solare.

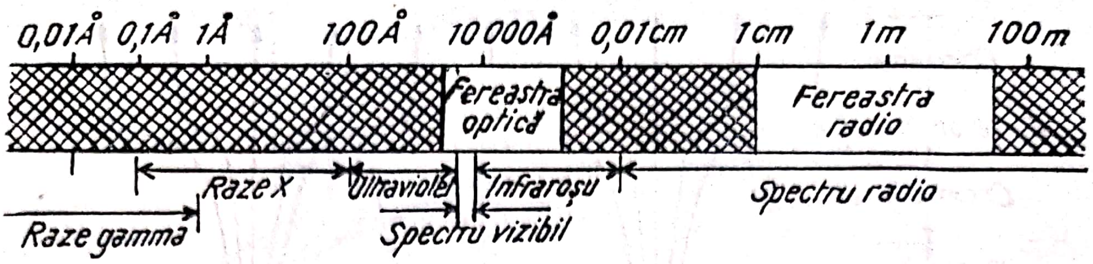


Fig. 4-12 — Spectrul vizibil al radiațiilor electromagnetice, reprezentat de o porțiune îngustă din „fereastra optică" a atmosferei terestre (după Sîngeorzan și Ștefan, 1987).

Lumina solară se propagă radial în spațiul infinit, în sistem inerțial, cu viteza supremă invariabilă de 300 000 km/s[*], străbate[**] în 8 min 19 s cei 150 milioane de kilometri[***] de vid cosmic[****] pînă la Pămînt și ajunge la limita exterioară a atmosferei terestre, atingînd 1,99 cal/cm^{-2}·min^{-1} (constanta solară[*****], E_0), după care trece prin oceanul aerian pînă la suprafața globului (fig. 4-12).

Masa echivalentă energiei radiate de Soare într-o secundă este de aproximativ 5 milioane de tone, din care ajung pe Pămînt circa 5 kg/s. La puterea fluxului de ordinul a 10^{24} erg/s, cu densitatea de putere $p = 1{,}373$ W/m^2 a radiației solare incidente la suprafața planetei noastre, efectul radiativ asupra tuturor organismelor vii de pe *Terra* ar fi de-

---

[*] Viteza c de propagare a undelor electromagnetice în vid, stabilită de Maxwell încă din secolul trecut, se deduce din relația:

$$c = \frac{1}{\sqrt{\varepsilon_0 \cdot \mu_0}}$$

ε_0 fiind permitivitatea electrică a vidului iar μ_0 fiind permitivitatea magnetică a vidului. Înlocuind valorile numerice corespunzătoare, rezultă o valoare egală cu viteza luminii în vid:

$$c = \frac{1}{8{,}85 \cdot 10^{-12}\,\frac{F}{m} \cdot 12{,}56 \cdot 10^{-7}\,\frac{H}{m}} = 3 \cdot 10^8\,\frac{m}{s}$$

în care F=farad, iar H=henri. Mai exact, constanta vitezei luminii c=299,792,5 km/s.

[**] Parcursul luminii nu este o linie perfect dreaptă, ci se înscrie pe un arc de cerc cu o rază de curbură foarte mare (conform teoriei relativității generalizate, emisă de Einstein).

[***] Mai corect 149,5 milioane de km reprezintă semiaxa orbitei terestre, avînd denumirea de unitate astronomică (u.a.).

[****] Substanță interplanetară, egală cu 10^{-24} g/cm^3.

[*****] Cantitatea totală de energie pe care o primește în timp de un minut o suprafață de 1 cm^2, dispusă perpendicular pe razele Soarelui la limita atmosferei terestre, pentru distanța medie de la Pămînt la Soare este:

$$E_0 = 1{,}99\,\frac{cal}{cm^2 \cdot min}$$

zastruos, chiar letal, dacă nu ar exista stratul protector de 150 km grosime al atmosferei inferioare* și în special stratul subțire de ozon stratosferic. Impactul cu molecula de ozon** face ca acest colosal torent de radiații solare să fie reflectat (difuzia Reyleigh), absorbit și dispersat în atmosfera terestră, ajungînd încetinit, filtrat și atenuat la nivelul suprafeței Pămîntului, care primește astfel, pe întreaga sa emisferă iluminată de Soare, o energie egală doar cu 10^{24} erg/s *(radiația globală)*.

Repartiția radiației solare deasupra globului este condiționată de mișcările Pămîntului, de înclinarea axei sale față de planul eclipticei*** și de forma sa de geoid. Pămîntul recepționează de la Soare $17{,}6 \times 16^{16}$ W, preluînd deci numai $0{,}5 \times 10^{-9}$ din energia emisă de astrul zilei. Prin *radiația terestră (calorică* sau *radiație de unde lungi)* acesta reflectă înapoi în spațiu cca 30% din energia luminoasă primită de la Soare (*albedo*****), restul de 70% fiind absorbită în parte de atmosferă datorită bioxidului de carbon și vaporilor de apă, o altă parte fiind reținută de desfășurarea ciclului hidrologic și numai o ultimă parte rămînînd la suprafața reliefului, unde este implicată în procesele de fotosinteză, încălzirea solului etc.

Toată gama fenomenelor de absorbție citate, care provoacă extincția***** și modificarea spectrului radiativ al razei de Soare, aduce o scădere a intensității sale care variază între 10%, în condițiile aerului uscat și curat, pînă la 30%, în condițiile aerului umed bogat în vapori de apă (Stăncescu și Ballif, 1981).

Lumina este recepționată neuniform de suprafața Pămîntului, între cele două tropice ajungînd cantități maxime, iar în regiunile polare — cea mai redusă cantitate. Diferențieri importante se înregistrează și pe verticală, la fiecare 1 000 m înălțime temperatura scăzînd *(gradient termic vertical)* în medie cu 6,4°C, deși radiația solară este mai puternică la altitudini mai mari.

Lumina integrală ajunsă la suprafața terestră are două componente (directă și difuză), iar distribuția energiei luminoase este inegală, cea mai mare cantitate de energie luminoasă din spectrul solar aflîndu-se în domeniul radiațiilor cu lungimea de undă de 4 800 Å.

---

* Compusă din azot și oxigen, precum și din praf, bioxid de carbon și vapori de apă.

** Ozonul (O_3) aflat la 24 km altitudine, consituie o modificație alotropică a oxigenului (O_2) din care se formează sub acțiunea radiațiilor UV.

La nivelul solului, datorită gazelor de eșapament ale automobilelor, se formează de asemenea ozon, dar contaminat, care reprezintă deci un important agent poluant în stare gazoasă (238 imeca reprezentînd o unitate de măsură a calității aerului). Pentru prevenirea efectelor nocive ale poluării atmosferei terestre și prezervarea calității mediului ambiant, numeroase state au aderat la Protocolul de la Montreal (1987), care stipulează reducerea cu 50% a consumului de clorofluorocarbonați (CFC), pe parcursul a zece ani, prevăzut a fi urmat de un plan mai riguros de reducere cu 90% a clorofluorocarbonaților după anul 1999.

*** Planul în care Pămîntul se rotește în jurul Soarelui, corespunzînd cu traiectoria aparentă (pe boltă) a Soarelui.

**** Intensitatea cu care planetele reflectă lumina solară, după natura și culoarea suprafeței lor și în raport cu alți factori.

***** Extincția reprezintă micșorarea sau anularea intensității unui fascicul de lumină.

Asupra virusurilor, lumina solară are o acțiune distructivă direct proporțională cu intensitatea și durata expunerii și invers proporțională cu lungimea de undă ; astfel, arbovirusul Semliki Forest este inactivat cu atît mai rapid cu cît lungimea de undă a luminii este mai scurtă.

Spectrul solar, fiind variabil cu anotimpul, cu momentul zilei și cu direcția sau difuzia luminii, prin conținutul său diferit în radiații UV, calorice și cosmice (maxime fiind în luna iunie între orele 12—14, aplicate direct), are o influență diferită asupra virusurilor ; astfel, virusul aftos este inactivat vara într-o oră în mediul natural, sau în 2—3 zile dacă recepționează radiația solară în laborator prin geamul de sticlă (care oprește în mare măsură radiațiile UV), toamna — în 4 săptămîni (în septembrie-noiembrie) și iarna — pînă la 67 de zile (lumină difuză, indirectă, de slabă intensitate). Datorită acestor cauze, iarna virusul gripal, aflat în concentrație mare aerosolizat, favorizează epidemiile de gripă.

Lumina solară acționează diferit de la un germen patogen la altul, dar și funcție de compoziția mediului în care este inclus, știut fiind că albuminele sau substanțele de balast protejează virusul, preluînd asupra lor energia radiantă : virusul pestei porcine rezistă în sînge 22 de zile la lumină, 3—10 zile în fecale și 6—7 zile în urină. Dimpotrivă, substanțele colorante, acționînd prin sinergism cu radiația luminoasă, fotoinactivează unele virusuri.

Radiațiile ultraviolete (UV) există, pe de o parte, în mod natural în componența luminii solare (vezi tabelul 4-II) și, pe de altă parte, pot fi produse artificial în lămpile de cuarț cu vapori de mercur sau în alte instalații (tabelul 4-III), prin trecerea unui curent electric, emițînd radiații cu lungimea de undă între 50 și 3 900 Å.

TABELUL 4-III

Emițători de radiații UV și lungimea de undă a radiațiilor UV emise

Emițător	Lungimea de undă Å
Lămpile electrice cu filament metalic	3 200
Soarele de altitudine	2 900
Flacăra de magneziu	2 800
Arcul electric între electrozii de cărbune	2 500
Lampa de cuarț cu vapori de mercur	1 942
Gazele luminescente	1 030

Una dintre primele cercetări, devenită clasică, privind acțiunea radiațiilor UV s-a făcut asupra virusului rabic, în 1929, de către Phisalix și F. Pasteur, care au demonstrat acțiunea virulicidă a acestor radiații, cu pierderea concomitentă a activității antigenice. Mai tîrziu, în 1940, Hodes și colab. au arătat că radiațiile UV pot reprezenta un agent prețios pentru a face nevirulent virusul rabic fix și a-i păstra, în același timp, întreaga sa capacitate imunogenă.

Radiațiile UV au o penetrabilitate redusă în țesuturi, acestea, ca și albuminele sau substanțele de balast din soluție, conferind o oarecare protecție virusurilor aflate în aceste medii. Puterea virulidică a radiațiilor UV este direct proporțională cu diluția virusului, precum și cu doza, intensitatea și durata de expunere la radiații și se explică prin intervenția lor nocivă la nivelul unor legături labile din moleculele virale. Capacitatea inactivantă depinde în mare măsură de lungimea de undă a radiației, în jurul a 2 600 Å, fiind cea mai distructivă întrucît corespunde cu cîmpul de absorbție al acizilor nucleici (virusurile gripale și herpetice, la 2 537 Å). Unele virusuri — așa cum este virusul sarcomului Rous — au un spectru de sensibilitate mai larg, sugerîndu-se că aici intervin și procese fotochimice, în urma cărora anumite grupe și legături proteice sînt afectate ; virusul aftos, spre exemplu, este inactivat în 5 min la lungimea de undă 5 720—2 300 Å.

Sensibilitatea diferiților germeni patogeni la radiațiile UV este variabilă : poliovirusul este distrus în fracțiuni de secundă ; virusul rabic — în 0,17—0,33 s ; virusul urlian — în 0,28 s ; virusul hepatitei A — în 60 s ; virusul rujeolic — în 100—120 s ; virusurile rabic de stradă și aftos — în 5 min ; virusul variolei aviare — în 20 min, iar virusul vaccinal — în 45 min.

Viteza inactivării (λ) a fost calculată în cazul unor virusuri, cum este cel rujeolic (Cernescu, Șorodoc și Cajal, 1978) prin metoda celor mai mici pătrate, după formula :

$$\lambda = \frac{d}{dt} \ln \left(\frac{N_0}{N} \right)$$

în care d/dt reprezintă simbolul pentru operația de derivare în raport cu variabila d ; ln = logaritm natural ; raportul N_0/N reprezintă scăderea relativă a titrului după iradiere în raport cu titrul inițial N_0 ; t este durata iradierii în secunde, semnificația statistică a diferențelor existente între diferite valori medii fiind apreciată prin testul „*T*“ Student.

Rezistente la lumina ultravioletă sînt virusul hepatitei B, virusul pestei porcine (la 2 537—3 050 Å), iar virusurile neconvenționale (Kuru, Creutzfeldt-Jakob și Scrapie) sînt neobișnuit de rezistente la 2 540 Å.

Unele virusuri sînt inactivate total de radiațiile UV (arbovirusul West Nile), altele își păstrează structura antigenică intactă, astfel încît pot fi utilizate în reacții serologice (virusul gripal) sau în tehnologia de preparare a vaccinurilor. Webster și Casals (1940), Habel (1947), Corwin și Stice (1947) au preparat în acest mod un vaccin antirabic, prin expunerea suspensiei virulente la radiații UV, care a protejat șoarecii împotriva a 10 000 DLM (doza-limită mortală); în timp ce alt tip de vaccin antirabic — cum este cel cloroformat — mai puțin eficient, nu a protejat aceleași animale decît împotriva a 1 000 DLM.

Radiațiile ionizante. Un tip de radiație se numește „ionizantă“ dacă cuanta sa de energie *(E)* este suficient de înaltă (E⩾10 eV) pentru a îndepărta definitiv electronii dintr-o structură atomică sau moleculară, producînd astfel ionizarea materiei — inerte ori biologice —. Particulele radiației, ele însele, pot fi încărcate (ionizante direct) sau neîncărcate (ionizante indirect) (tabelul 4-IV).

TABELUL 4-IV

Radiațiile ionizante

Simbol	Tipul	Masa	Încărcătura electrică	Produse de:
Radiații ionizante direct				
α	${}^4_2He$	4	2+	Dezintegrare nucleară
β^-	e^-	0,000549	—	Dezintegrare nucleară
β^+	e^+	0,000549	+	Dezintegrare nucleară
P	${}^1_1H$	1	+	Accelerator liniar
d	${}^2_1H$	2	+	Accelerator liniar
Radiații ionizante indirect				
γ	Radiații electromagnetice	0	0	Dezintegrare nucleară
X	Radiații electromagnetice	0	0	Tub Röntgen
n	${}^1_0n$	1	0	Dezintegrare nucleară, fisiune nucleară

Trebuie precizat că în natură există cîteva constante fundamentale (cantități care au aceeași valoare numerică în orice moment și oriunde în Univers); astfel, atomul de hidrogen — cel mai simplu și totodată cel mai abundent element din natură — este același pe *Terra*, ca și oriunde în spațiul cosmic: are aceeași mărime, masă și sarcină electrică internă, protonul fiind de 1 836 de ori mai greu decît electronul, iar sarcina electrică de $1{,}602 \times 10^{-19}$ coulombi.

În timpul penetrării lor în materie, radiațiile ionizante produc în lungul traseului lor un număr mare de ionizări și excitații ale atomilor, toate putînd conduce la consecințe chimice și biologice. Eliberarea energiei din radiație prin ionizare sau excitare a atomilor este primul pas fizic într-o lungă secvență de reacții secundare care pot conduce în final la un efect biologic al radiației. În conformitate cu teoria lui Blau și Altenbürger (1923), în urma lovirii directe a unei „ținte“ radiosensibile de către o radiație se produce distrugerea ei; prin urmare inactivarea virusurilor are loc chiar și cînd o singură ionizare se produce în interiorul structurii lor sensibile. Valoarea populației virale care a rezistat la iradiere poate fi apreciată prin aplicarea formulei:

$$\frac{N}{N_0} = e^{-KD}$$

în care N exprimă numărul rezidual al particulelor infectante; N_0 = numărul particulelor infectante existente înainte de iradiere; K reprezintă coeficientul de inactivare al particulelor virotice pe unitatea de doză; D este media elementelor inactivate și e — baza logaritmilor naturali.

Efectele radiațiilor ionizante asupra biomoleculelor și structurilor moleculare sînt distrugătoare *in vitro* în domeniul a 10 gray (Gy) pentru proteinele structurale virale, iar în privința acizilor nucleici se poate considera că alterarea sau distrucția unei baze din 10 000 poate fi adesea de importanță biologică. Desigur, nu poate fi posibil să se identifice alterări așa de mici; o detecție chimică a efectului radiației în molecula de acizi nucleici este posibilă numai după un tratament cu doze mari de radiații (care are, de altfel, densitatea nucleului atomic, de 100 miliarde $kg \cdot cm^{-3}$), ruperile de lanțuri și alterarea bazelor fiind cele mai importante efecte la acest nivel.

Radiațiile ionizante direct (radiațiile corpusculare) cuprind *radiațiile alfa* (α) emisie de particule încărcate cu două sarcini elementare pozitive — nuclee de heliu) și *radiațiile beta* (β) (flux de electroni cu o diversitate de viteze și energii ale electronului), radiații corpusculare cu mare putere de ionizare.

În cazul acestui tip de radiații, se poate calcula energia de disipare *(stopping power)* descrisă pentru toate particulele grele încărcate, prin formula lui Bethe:

$$-\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi N_A}{m_e} \cdot \frac{e^4 \cdot z^2}{v^2} \cdot \rho \cdot \frac{Z}{A} \cdot B$$

în care $\frac{dE}{dx}$ = viteza de variație a energiei; N_A = numărul lui Avogadro; m_e = masa de repaus a electronului; e = încărcătura elementară a particulei; z = numărul atomic al particulei; v = viteza particulei; ρ = densitatea materiei absorbante; Z = numărul atomic al materiei absorbante; A = greutatea atomică a masei absorbante;

$$B = \ln\left(\frac{2m \cdot v^2}{I \cdot (1 - \beta^2)} - \beta^2\right)$$

în care: I = potențialul de ionizare al materiei absorbante; $\beta = \frac{v}{c}$ (în care c = viteza luminii).

Aplicînd formula lui Bethe la scară macromoleculară virală, rezultă net ineficiența utilizării radioizotopilor la iradieri alfa sau beta, în doze mici, direct asupra virusurilor (detalii nanometrice), astfel încît în Laboratorul Central de Radiovirologie din Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau“ nu am utilizat, în acest mod, acest tip de radiații. Experiența noastră s-a materializat însă într-un vast studiu al evoluției unor viroze animale sub efectul radiațiilor ionizante; aplicînd intern radiații beta sau gamma (prin inocularea de soluții fiziologice conținînd 25 μCi de ^{32}P sau ^{131}I), am obținut exacerbarea susceptibilității șoarecelui alb adult la acțiunea patogenă a virusurilor gripal, Coxsackie, poliomielitic, rabic, herpetic, al encefalitei de căpușă, hepatitei murine (tip 2 și 4). Aceasta s-a reflectat într-o reducere a perioadei de incubație, printr-o moarte mai rapidă a animalelor și printr-o mai intensă multiplicare în diferite organe (Cajal și colab., 1960, 1961, 1962, 1963, 1964, 1965 ; Burducea și colab., 1961, 1962). După cum au arătat Cajal și colab. (1960, 1961), iradierea internă a animalelor permite infecția experimentală cu unele virusuri și pe alte căi decît cele de elecție (de exemplu, virusul MEF 1 — poliomielitic de tip 2, aplicat pe cale peritoneală și subcutană), iar virusul Coxsackie A2, nepatogen pentru șoarecele alb adult, a provocat la acest animal iradiat o boală paralitică mortală (Cajal și colab., 1960).

În laboratorul nostru am pus, de asemenea, în evidență o descreștere manifestă a nivelurilor properdinei serice, precum și scăderea titrurilor de anticorpi HAI la șobolanii imunizați antigripal, sub acțiunea radiațiilor emise de ^{32}P și ^{131}I (Burducea și colab., 1961, 1962, 1979 ; Cajal și colab., 1961, 1964).

Pe baza acestor rezultate, Cajal și colab. (1962) au avansat ipoteza conform căreia creșterea nivelurilor naturale de radioactivitate ar putea avea o influență directă asupra morbidității virale, facilitînd apariția unor noi și severe boli.

Radiațiile ionizante indirect (Radiațiile electromagnetice). Sînt forme energetice de radiație electromagnetică în materie, a căror absorbție este caracterizată printr-o simplă expresie exponențială :

$$I_x = I_0 \cdot e^{-\mu x}$$

în care : I_x și I_0 reprezintă intensitățile de radiație înainte și după penetrarea stratului material x ; μ este coeficientul de absorbție, iar e = baza logaritmului natural.

Radiațiile X (radiații Röntgen, RX). Sînt radiații electromagnetice, fără masă și fără încărcătură electrică, produse în tuburi Röntgen — tuburi Crookes modificate la un vid înaintat (1/1 000 mm Hg) și la o diferență de potențial de ordinul kilovolților (60—300 kV), prin frînarea și devierea electronilor emiși cu viteza luminii de către oglinda anticatodică înclinată la 45°. Radiațiile X produc efecte biochimice care se traduc prin alterarea biologică sau fizico-chimică a variatelor structuri, a căror integritate este importantă pentru economia corpusculului viral. Conform teoriei țintei, probabilitatea ca un virus să fie lovit de către radiațiile X este de obicei exponențială, infectivitatea putînd fi asociată unei singure ținte sensibile (1/8—1/15 din volumul virusului), iar hemaglutinina inactivîndu-se după o curbă de inactivare corespunzătoare unui fenomen de „3 lovituri".

Funcție de dozele încasate și de tulpina iradiată, virusurile se comportă total diferit. La doze mici de radiații, virusurile sînt în general indiferente sau chiar stimulate. Astfel, din datele noastre experimentale (Cajal și colab., 1964) rezultă că antigenele gripale A/PR/8, A2 (Singapore) și B (England) se comportă diferit în reacția de hemaglutinare în raport cu antigenul vaccinal (dermovaccina) după iradierea X cu 100 R. Antigenele gripale determină o creștere evidentă a titrului hemaglutinant (de la 1/40 la 1/320 la tulpinile A și A2 și de la 1/160 la 1/320 pentru virusul B), menținîndu-se constant la acest nivel timp de 3 zile. Dimpotrivă, în aceleași condiții de iradiere, am constatat că virusul vaccinal prezintă o scădere a titrului hemaglutinant de la 1/40 la 1/20, titru care se menține la acest nivel timp de 30 de zile. Guilherm și colab. (1967) constată o creștere a virulenței virusului gripal, în consens cu rezultatele noastre obținute pe virusul gripal A_0/PR/8 din plămînii de șoarece sub acțiunea a 200—2 400 R (RX). Rickettsiile, deși de dimensiuni mari, ușor de atins, la doze mici de radiații (500—1 000 R), în mod paradoxal nu sînt afectate sau chiar sînt stimulate în procesul de multiplicare.

Dozele mari de radiații, înfrîngînd radiorezistența naturală ridicată a virusului, devin nocive începînd de la 5×10^4 R, virusurile neconvenționale rămînînd nealterate chiar la doze considerabile de radiații X de 2 540 Å, iar poliovirusul rezistînd 38 min. Virusul stomatitei veziculoase este distrus la $6,1\times10^4$ R, al pestei porcine — la 9×10^4 R, virusul Shope — la 8×10^5 R, virusul sarcomului Rous — la 10^6 R, iar virusul aftos — la $1,2\times10^6$ R.

Radiațiile gamma (γ) nu sînt emise niciodată singure, însoțind de obicei radiațiile beta și uneori radiațiile alfa. Fiind formate din particule fără sarcini electrice, radiațiile gamma ionizează doar indirect, printr-un fenomen rezultînd dintr-un proces secundar.

În doze mici, acțiunea radiațiilor gamma asupra virusurilor a fost încercată fără rezultate convingătoare (datorită și imposibilității de localizare strictă, în deceniul al 6-lea, a radioizotopului pe tumoră), utilizînd iodul radioactiv (^{131}I) ; astfel, Wissler și colab. (1956) au găsit că această acțiune este slabă sau chiar fără nici o indicație de localizare tumorală a preparatelor purificate de anticorpi marcați la tumora de șobolan Flexner-Jobling sau sarcomul de șobolan Jensen. Mason și colab. (1954) nu au reușit să localizeze anticorpi antișoarece marcați cu ^{131}I în melanomul transplantat la acest animal. Bale și colab. (1955) au arătat că anticorpii anticarcinom 256 de șobolan Walker se localizau mai degrabă în rinichi, ovar și splină, decît în tumori. În sfîrșit, alte lucrări privind anticorpii marcați cu localizare tumorală sînt neconfirmate (Stern, 1956 ; Rose, 1955) sau demonstrează că această localizare nu este specifică (Pressman și Korngold, 1953). Cu toate rezultatele negative semnalate, Day și colab. (1956), Pressman și colab. (1957) și Bale și colab. (1958) au comunicat că anticorpii marcați cu ^{131}I, preparați din gammaglobulinele de iepure imunizat împotriva limfosarcomului transplantat la șobolanul Murphy, după inocularea intravenoasă, au o localizare cu o specificitate considerabilă pentru tumoră, anticorpii servind ca purtători de radioactivitate, spre a o transporta pe aceasta în țesutul canceros, în scopul de a iradia și distruge celulele canceroase.

În doze înalte, radiațiile gamma emise în debite mari din instalații speciale cu cesiu (^{137}Cs) și îndeosebi cobalt radioactiv (^{60}Co) au o acțiune categoric distructivă asupra virusurilor. Ele au fost utilizate la prepararea antigenelor-diagnostic neinfectante, deoarece prin această metodă a fost posibil să se distrugă infectivitatea, în timp ce activitatea fixatoare de complement a antigenelor rămînea neafectată (Polley, 1961).

Suspensiile apoase de virus, purificate, supuse la bombardamentul radiațiilor gamma, își pierd infectivitatea și antigenicitatea. Prin adăugarea de agenți protectori la suspensiile purificate de virus gripal, Polley (1962) a obținut preparate lipsite de infectivitate, dar cu capacitatea he-

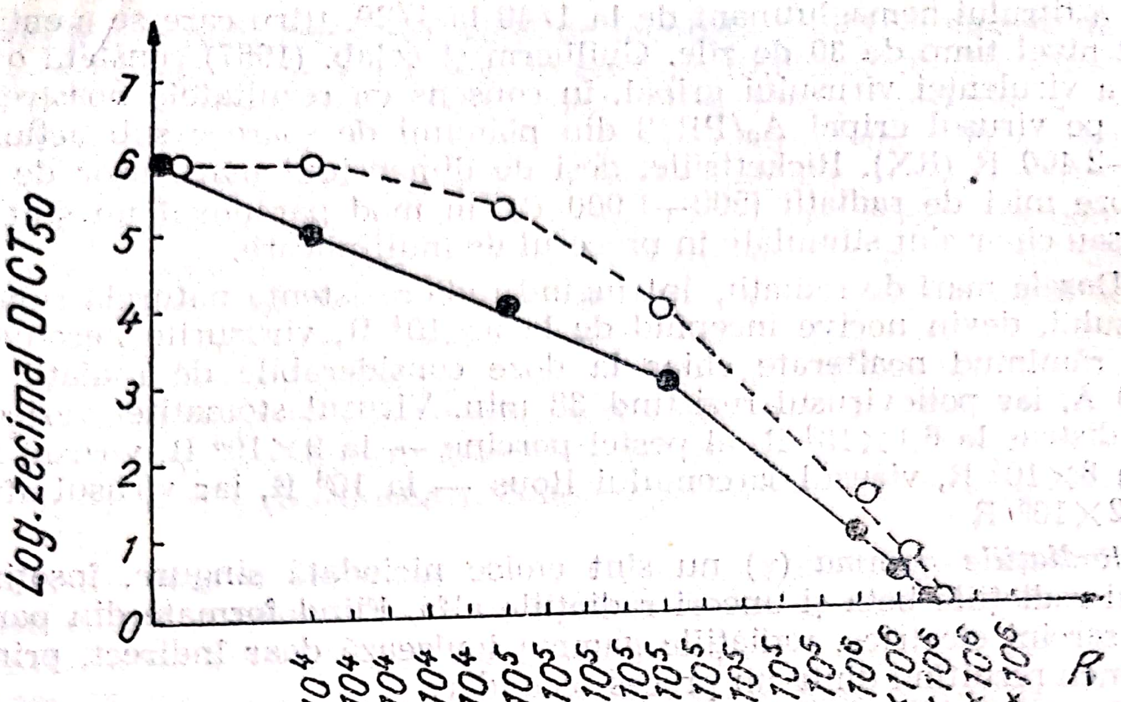


Fig. 4-13 — **Infectivitatea virusului paragripal de tip 3, tulpinile C 243 (o______ o) şi D (o- - - - -o), supus iradierii gamma (după Burducea şi colab., 1973).**

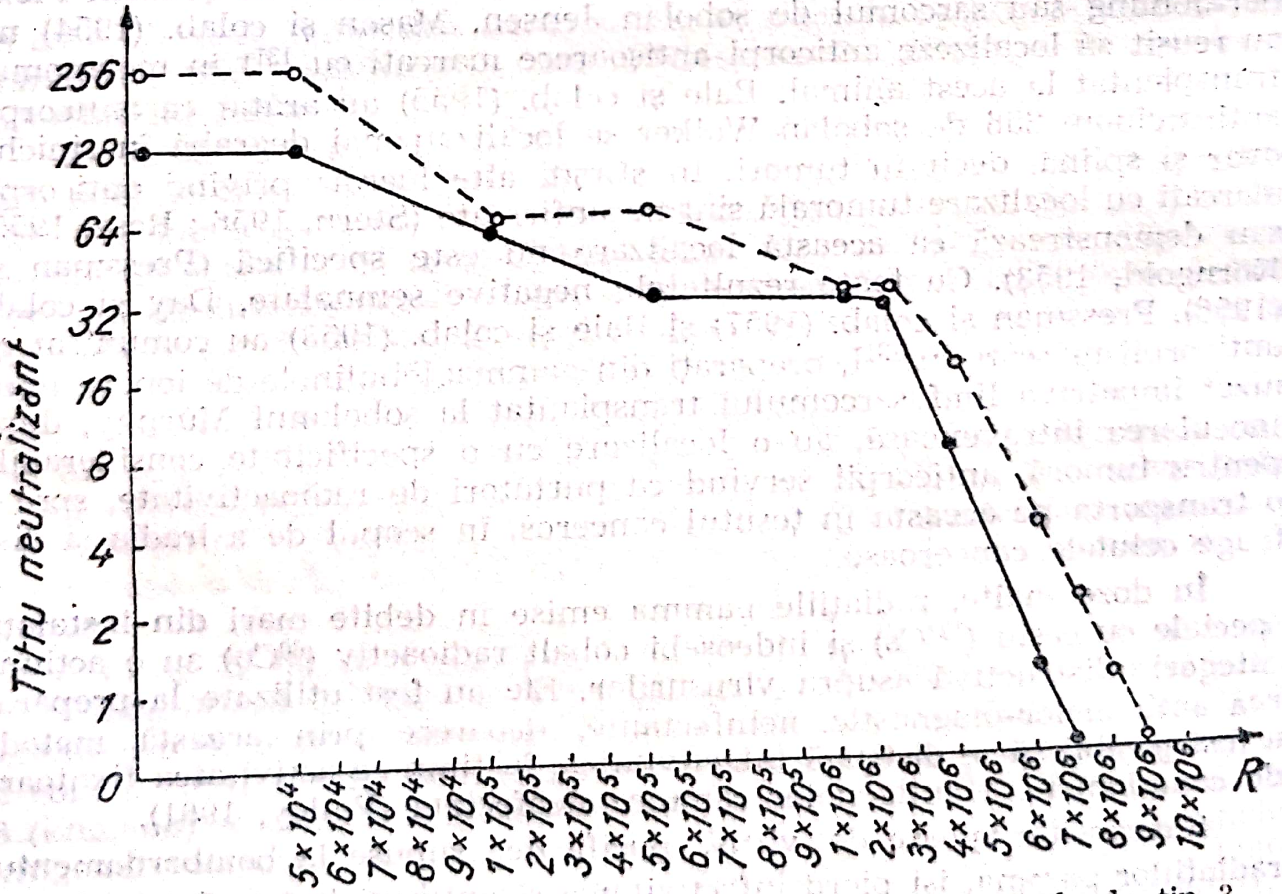


Fig. 4-14 — **Capacitatea neutralizantă a serurilor antiparagripale de tip 3, tulpinile C 243 (o______ o) şi D (o- - -o), supuse iradierii gamma. (după Burducea şi colab., 1973).**

maglutinantă păstrată. Cu același tip de radiație, la o doză de $2,7 \times 10^5$ rad, Polatnick și Bachrach (1968) au reușit să inactiveze virusul febrei aftoase la $4,09 \times 10^5$ rad ; Logan și Whitmore (1965) au distrus virusul polyoma la 4×10^6 rad ; Hrusková (1969) a inactivat virusurile encefalomielitei de West și arbovirusul encefalitei de căpușă, iar Reitman și Tribble Jr. (1967) au inactivat virusul encefalomielitei ecvine de Venezuela la 6×10^6 R.

Experiența noastră privind acțiunea radiațiilor gamma asupra virusurilor a confirmat importanța acestei modalități moderne de inactivare, care poate fi extinsă chiar și la scară industrială pentru sterilizare. Astfel, împreună cu Y. Șorodoc (1968) am obținut inactivarea virusului rujeolic la 5×10^5 R și, împreună cu G. Șorodoc (1964), inactivarea virusului bronhopneumoniei enzootice porcine. Pentru inactivarea a două tulpini ale virusului paragripal de tip 3 au fost necesari 3×10^6 R (fig. 4-13 și 4-14), iar pentru virusul urlian, 10^6 R (Burducea și colab., 1973).

Abordată încă din 1904, de către Green, problema utilizării virusurilor inactivate cu ajutorul radiațiilor ionizante nu a fost în timp nici rezolvată, nici abandonată. Mai tîrziu, în 1962, Polley a preparat un vaccin antigripal pentru șoarece prin inactivare cu ajutorul radiațiilor gamma, pornind de la o tulpină porcină adaptată la șoarece, care, deși și-a dovedit puterea protectoare, nu a condus pînă în prezent la utilizarea largă în tehnologia de preparare a vaccinurilor.

4.2.2. AGENȚII CHIMICI

Capsida proteică virală sau, la virusurile mai complexe, anvelopa lipidică și glicoproteică protejează acidul nucleic de agresiunile fizico-chimice externe, păstrîndu-i integritatea necesară replicării intracelulare. O serie de substanțe chimice însă reușesc să distrugă această barieră, fie prin interacțiunea lor cu structurile virale de suprafață — prin precipitarea proteinelor, solubilizarea lipidelor etc. și, odată pătrunse la acidul nucleic, îl atenuează sau inactivează total —, fie prin inhibarea selectivă a multiplicării virale la contactul direct cu celulele în care are loc biosinteza virală.

4.2.2.1. *Alcoolii*

Glicerina (glicerolul). Încă din 1887, Roux a arătat că glicerina neutră, la 30° Beaumé, permite conservarea virulenței creierului și a măduvei de iepure infectate cu virusul rabic. Măduvele desicate la 23°C, timp de 6—3 zile, menținute apoi în glicerină, își păstrau același grad de virulență pe care îl aveau înainte de glicerinare, timp de aproape o lună. Patru ani mai tîrziu, Calmette a aplicat calitatea conservatoare și fixatoare a glicerinei față de virusul rabic fix la vaccinarea antirabică, trecînd în glicerină întreaga serie de măduve uscate, după metoda pasteuriană, și utilizîndu-le apoi în decursul următoarelor 2—3 săptămîni. Această metodă avea să fie adaptată, din anul 1911, de către Institutul Pasteur din Paris, așa cum arată Cruveilhier și Viala, pentru prepararea curentă a vaccinului antirabic.

Astăzi, datorită însuşirii sale hidrofile, glicerina este una dintre cele mai folosite substanţe pentru conservarea virusurilor ; dar, pentru a evita acţiunea nocivă a glicerinei pure asupra virusurilor la 30°Beaumé, aşa cum postula Rochaix în 1923, aceasta se utilizează diluată cu apă distilată în proporţie de 50%, soluţiile tamponate fiind cele mai indicate. Asocierea cu frigul (+4°C sau temperaturile negative) optimizează şi prelungeşte timpul de stocare a materialelor virulente. Astfel, la +4°C, glicerina permite conservarea timp de 7 săptămîni a virusului urlian izolat (Johnson şi Goodpasture, 1934), 8—15 săptămîni sau chiar 35—38 săptămîni a virusului rabic fix în stare de desicaţie (Gricz, 1950). Este posibil ca după o scurtă conservare în glicerină (de 7—15 zile), ţesutul nervos, în prealabil desicat, să poată fi reactivat prin acţiunea indirectă a glicerinei, care ar elibera din ţesuturi o parte din virusul fix (Dodero, 1938). Reactivarea virusurilor prin conservarea cu glicerină, a fost observată de Nicolau şi Kopciowska (1930) pentru virusul herpetic, dar nu şi pentru virusul rabic (Nicolau, 1930). În glicerină 50%, virusul febrei galbene îşi păstrează proprietăţile sale patogene cel puţin 60 de zile iar după 100 de zile infectivitatea sa scade treptat (Drăgănescu, 1970), în timp ce arbovirusul Louping-Ill îşi conservă infectivitatea timp de 4—6 luni (Lépine, 1931). Activitatea patogenă a virusului herpetic este păstrată în glicerină 50% de la cîteva luni şi pînă la 5 ani (Seidenberg, 1931), a poliovirusului — timp de 6 ani (Flexner şi Amos, 1917) sau chiar 8 ani (Rhoads, 1917), iar a virusului papilomului iepurilor — timp de 20 de ani.

Glicerina 50%, care distruge repede rickettsiile, la —10°C devine un bun conservant pentru acestea, prelungindu-le longevitatea pînă la 10 luni, iar la 1—15°C, după P. Balozet şi L. Balozet (1938), virusul pestei porcine îşi păstrează virulenţa intactă timp de peste 5 ani.

În glicerină, virusurile termină însă prin a se atenua şi a-şi pierde complet virulenţa după un timp determinat, care variază cu specia virusului, cu temperatura la care este conservat, cu schimbarea pH-ului şi cu fenomenele de oxidaţie care se petrec în recipient şi care conduc la oxidarea glicerinei iar în final la inactivarea virusului, cum este cazul virusului herpes simplex (Perdran, 1927). Acţiunea glicerinei, departe de a duce la reversibilitatea unui virus rabic fix spre virusul de stradă, determină atenuarea acestui virus.

Pentru optimizarea calităţilor conservante ale glicerinei, amintim asocierea acesteia cu fenolul 0,5% pentru păstrarea virusului rabic fix (Olah, 1938) ori a virusului pestei porcine (Whiting, 1926), sau cu cloroformul 1% pentru stocarea virusului rabic fix (Schneider şi Salem, 1931).

Alcoolul (alcoolul etilic, etanolul). Alcoolul are un efect inactivant asupra virusurilor, direct proporţional cu concentraţia în care este utilizat şi cu temperatura ; pînă la un punct, modificările pe care le antrenează sînt reversibile. Virusurile cele mai simple sînt mai rezistente la acţiunea alcoolului, virusul febrei aftoase rezistă la acţiunea alcoolului 75%, în timp ce arbovirusul Blue Tongue este distrus în 1—2 min de alcoolul 70%. În ceea ce priveşte virusul herpetic, rezultatele semnalate sînt contradictorii ; astfel, în timp ce Hawkins (1929) obţine inactivarea totală a virusului cu ajutorul alcoolului, Holden (1932) constată că alcoolul atenuează virusul fără a-l distruge complet. În ceea ce priveşte virusul febrei galbene (arbovirus de grup B — tulpina viscerotropă), supus efectului alcoolului 6,7%, este transformat din patogen în imunogen după 27 de zile de menținere la 2°C.

Alcoolul iodat. Alcoolul iodat 0,5—1% are un efect antiseptic moderat asupra virusurilor neconvenționale (Kuru, Creutzfeldt-Jakob și Scrapie) (Stetten și Carrigan, 1984), precum și asupra virusului hepatitei A, fapt ce-l recomandă pentru dezinfecția tegumentelor.

Trietilenglicolul și propilenglicolul. Trietilenglicolul (1 g/100—200 m^3 aer) și propilenglicolul (1 g/2 000—3 000 L aer), sub formă de aerosoli, distrug virusul gripal aerosolizat.

4.2.2.2. *Fenolii*

Fenolul (acidul fenic). În 1906, Claudio Fermi a remarcat capacitatea antiseptică a fenolului asupra virusului rabic. Deși virulența era atenuată și chiar complet suprimată, virusul își păstra încă puterea antigenică, ceea ce a condus la prepararea vaccinului antirabic Fermi — suspensie cerebrală 5% în soluție cloruro-sodică fenolată 1%, care continua să rămînă rabigenă timp de 8—12 zile. Atenuarea virusului rabic fix, sub acțiunea fenolului 1%, la temperatura camerei, este rapidă, devenind slab patogenă după cîteva ore și complet apatogenă după 24—72 de ore.

Efectele inactivant și distructiv ale fenolului sînt variabile funcție de concentrația sa, ori de specia virală. Astfel, inactivarea are loc la o concentrație de 0,25% fenol pentru corpusculii trahomatoși, de 0,3% pentru virusul amaril și de 1% pentru herpesvirus. Concentrația 5% acționează ca un antiseptic sever asupra virusului pestei porcine, distrugîndu-l în 5 min; pentru același virus, fenolul, la concentrația de 0,5—0,75%, acționează, dimpotrivă, ca un conservant. Asupra virusului encefalitei de St. Louis, fenolul 1% are un efect mai slab, corpusculul viral rezistînd la această concentrație timp de 25 de zile.

Derivații fenolului. Au o acțiune nocivă variabilă asupra virusurilor, dependentă de substratul în care acestea sînt încorporate.

Crezolul. Sub formă de soluție 6% nu are acțiune nocivă asupra virusului pestei porcine nici după 30 min de contact. Virulența virusului poate fi însă diminuată prin tratarea cu cello-crezol, conținînd 20% crezol și un procent ridicat din această substanță din grupul hidrocarburilor. Alți dezinfectanți din grupul crezol (*bacilolul*, *betalizolul* și *acidul sulfuric crezolat*) sînt mai eficienți, distrugînd virusul în 30 min.

Lizolul. Este un bun antiseptic, folosit curent în laboratoarele de specialitate, distrugînd majoritatea virusurilor. Menționăm că în soluție 3—5%, Lubbadze și Gaidamovici îl utilizează la distrugerea în 3—5 min a virusului encefalitei. Virusul pestei porcine, care are o mare rezistență față de agenții chimici, este distrus într-un timp mult mai îndelungat.

Fenolii poliatomici. *Rezorcina și hexilrezorcina.* Distrug în 3—7 min virusurile gripale.

4.2.2.3. *Aldehidele*

Formolul (formaldehida, aldehida formică, formalina, soluţia apoasă de formaldehidă). Formaldehida este una dintre puținele substanțe chimice care distruge marea majoritate a virusurilor. O importanță deosebită o prezintă capacitatea acesteia de a conserva caracterele antigenice virale, fiind astfel larg utilizată la prepararea vaccinurilor. Formaldehida, interacţionînd cu grupările amino- ale proteinelor virale, conduce la formarea de mono- și dimetilderivaţi, iar cu acizii nucleici duce la blocarea grupărilor NH_2 din lanţurile de acizi nucleici, fără repercusiuni însă asupra valenţelor antigenice ale virusului.

În 1914, Cumming a arătat că formaldehida 0,08% inactivează virusul rabic fix în 2 ore, în timp ce virusul rabic de stradă nu este complet inactivat de formol decît la concentrația de 1%, după un contact de 2 ore (Galea, 1929). În decursul anilor au fost testate diverse concentrații de formol pentru o serie largă de virusuri, stabilindu-se concentrația optimă de utilizare a acestuia. Astfel, virusul hepatitei A este sensibil la formaldehidă 0,025% și este distrus în 72 de ore, iar formolul 0,1% inactivează virusul encefalitei de St. Louis în 12—18 ore, la temperatura camerei. În concentrație de 0,2% formolul inactivează virusul encefalitei japoneze B, cu păstrarea proprietăţilor sale antigenice (Sabin și colab., 1943), distruge virusul febrei galbene, inactivează complet virusul West Nile și distruge infectivitatea virusului urlian în 24 de ore, la +4°C, neatacînd hemaglutinina ori antigenul fixator de complement. Pentru inactivarea virusului rujeolic, cu păstrarea nealterată a antigenicităţii, s-a folosit formaldehidă 0,25% (Warren și Gallen, 1963). Tratarea virusului Coxsackie cu 0,3% formaldehidă duce la inactivarea rapidă a acestuia, iar proporția de 0,4% inactivează în 2 zile, la 20°C, virusul encefalitei ecvine de West. Supus acţiunii formolului 0,5%, virusul encefalitei de căpușă precum și virusul pestei porcine se inactivează rapid. Expunerea de purificate de virus al hepatitei B la acţiunea formaldehidei 5%, timp de 15 min, este urmată de alterări ale structurii particulei Dane, în 2 ore de contact, numai 1% dintre particule rămînînd intacte.

Glutaraldehida. În contact cu particulele de virus al hepatitei B, glutaraldehida 2% duce la degradarea intensă și reducerea cu 80% a numărului particulelor Dane și la abolirea infectivităţii acestui virus față de cimpanzeu (Thraenhardt, 1978), în aceeași concentraţie de 2% fiind sterilizantă și pentru virusul hepatitei A.

Cloratul (tricloracetaldehida). Este un alt dezinfectant care, în soluţie de 5%, distruge virusul pestei porcine în 30 min.

4.2.2.4. *Solvenţii organici ai lipidelor*

Eterul (eterul etilic). Acţionează asupra virusurilor înzestrate cu un înveliș extern prin solubilizarea substanţelor lipoide din structura acestuia, conducînd la inactivarea virusului, în timp ce în cazul celor neanvelopate acest fenomen nu se produce, corpusculul viral rămînînd nealterat.

a) Virusurile eter-sensibile. Încă din 1918 Remlinger și în 1922 Alivisatos au atras atenția asupra acțiunii atenuante a eterului și asupra efectului imunizant exercitat de virusul rabic tratat cu eter. Virulența creierului infectat cu virusul rabic diminuează rapid, virusul fiind întotdeauna inactivat după 84 de ore, partea centrală a creierului acoperită cu eter putînd încă să provoace turbarea după 114 și chiar 168 de ore. Myxovirusurile își pierd rapid infectivitatea, așa cum sînt virusul rujeolic față de eterul 25% (în 2 ore, la 4°C) și, selectiv, virusul gripal, a cărui capacitate hemaglutinantă este diminuată, în timp ce factorul care intervine în fixarea complementului rămîne neinfluențat. De asemenea, tratarea virusului urlian cu eter la 4°C îi distruge infectivitatea, iar la temperatura camerei această substanță realizează desfacerea particulei virale în subunități. Mai notăm că și arbovirusul de grup B, al encefalitei de St. Louis, este sensibil la acțiunea eterului.

b) Virusurile parțial rezistente la acțiunea eterului sînt virusurile variolice, encefalomielitei ecvine americane, iar virusul herpes simplex este atenuat fără a fi distrus complet.

c) Virusurile eter-rezistente sînt virusurile febrei aftoase, adenovirusurile și virusul Blue Tongue din grupul B al arbovirusurilor.

Cloroformul. Inactivează total virusul herpes simplex ; de asemenea, virusurile gripale și paragripale sînt sensibile la cloroform — fapt indicat de descreșterea titrului virusului tratat cu cloroform, comparativ cu martorul. Virusurile neconvenționale (Kuru, Creutzfeldt-Jakob, Scrapie) sînt moderat sensibile la acest agent chimic, virusul rujeolic își pierde infectivitatea fără însă ca aceasta să aibă vreo influență asupra titrului hemaglutinant (10 min de contact cu cloroform 5%), virusul Blue Tongue este relativ rezistent, iar virusurile polio, Coxsackie, ECHO și adenovirusurile sînt rezistente.

Acetona și toluenul. Inactivează total marea majoritate a virusurilor — compromițînd totodată și antigenicitatea acestora —, mai rezistente fiind virusurile mici.

4.2.2.5. *Detergenții sintetici și săpunurile naturale*

Detergenții, electroliți organici cu acțiune de suprafață (cei cationici, chiar în diluții foarte întinse), denaturează proteina virală, soldîndu-se în final cu inactivarea germenilor.

Dezoxicolatul de sodiu. Inactivează myxovirusurile și arbovirusurile de grup B, ale encefalitei de St. Louis și Louping-Ill, virusul Blue Tongue fiind relativ rezistent. Substanța nu are însă nici un efect asupra virusurilor mici care nu conțin lipide — virusul hepatitei A, al encefalomiocarditei șoarecilor și enterovirusurilor.

Dodecilsulfatul de sodiu (sulfatul lauril de sodiu). Are efecte diferite în interacțiunea sa cu virusurile, dintre care notăm că arbovirusul Louping-Ill este sensibil la această substanță.

Tween-80. Are o acțiune inactivantă asupra capacității infectante a virusurilor, fără a afecta însă componentele hemaglutinantă și fixatoare de complement, care au o densitate mai mare decît cea a particulei virale integrale.

Bromocetul (bromura de etilpirimidină). În concentrații de 10—20% are proprietăți virulicide remarcabile. Chiar și în concentrații întinse, de 0,01% sau 0,007%, după 3 și respectiv 60 min de contact cu AgHBs din serurile native, inhibă reactivitatea serologică a AgHBs (Morfei și Burducea, 1980).

Dezinfectantul cationic (sol. 20% de clorură de alchil-dimetil-benzil-amoniu). Produs indigen, este un antiseptic și dezinfectant cu spectru foarte larg de acțiune. Se utilizează ca antiseptic al pielii și mucoaselor (cu excepția mucoasei oculare), ca dezinfectant al suprafețelor de lucru, instrumentarului de laborator, instalațiilor, recipientelor și containerelor de lucru și transport. Produsul este incompatibil cu săpunul și cu detergenții anionici (de tip Dero, Alba etc.).

Săpunurile naturale. Săpunurile naturale moi (de potasiu) sau tari (de sodiu), sub formă de soluție, un efect virulicid remarcabil, iar acizii oleic sau linoleic și ricinoleatul de sodiu inactivează constant virusurile animale.

4.2.2.6. *Acizii și sărurile*

Această grupă de substanțe, mai restrîns utilizată, are unele aplicații în virusologie.

Acizii clorhidric, sulfuros și tanic. Acidul clorhidric 0,1 N inactivează virusurile Coxsackie, acidul sulfuros este un dezinfectant deosebit de activ pentru virusurile aftos și pestos aviar, acidul tanic — pentru virusurile gripale.

Salicilatul de sodiu și citratul de sodiu. Salicilatul de sodiu în soluție saturată inactivează virusul rabic într-un interval de timp de 1 pînă la 6 ore, iar virusul amaril este sensibil la acțiunea lentă a citratului de sodiu.

4.2.2.7. *Bazele*

Hidroxidul de sodiu (soda caustică, soluția de sodă, leșia de sodă). În concentrație de 0,5—1% nu este puternic virulicid, dar în soluție de 2% și, mai ales fierbinte, distruge virusul hepatitei A și virusul pestei porcine ; în concentrații de 5% este net rickettsicid, iar virusurile neconvenționale sînt moderat sensibile față de soluția 0,1—1 N.

Hidroxidul de calciu (varul nestins). Mai puțin cunoscut pentru proprietățile sale dezinfectante, este recomandat totuși ca virulicid în pesta porcină.

Bicarbonatul de sodiu. Este un inactivant lent, încît virusul rabic fix tratat cu această substanță își pierde virulența după 10—12 zile de contact.

4.2.2.8. *Agenții oxidanți*

Agenții oxidanți sînt nocivi pentru virusuri, ducînd după un timp la inactivarea acestora.

Apa oxigenată (peroxidul de hidrogen). În concentrație de 1‰ inactivează rapid virusul poliomielitic, fapt pentru care este utilizată în dezinfecții.

Permanganatul de potasiu și periodatul de potasiu. Sînt oxidante ce inactivează majoritatea virusurilor animale, soluția 1‰ fiind cunoscută a inactiva virusurile gripale, herpes- și poliovirusurile ; virusurile neconvenționale (Kuru, Creutzfeldt-Jakob și Scrapie) sînt moderat sensibile la acțiunea periodatului 0,01 M.

Oxigenul (O_2). Trecerea unui curent de oxigen prin suspensia virală sau menținerea acesteia într-o atmosferă de oxigen conduce la inactivarea unor virusuri. Astfel, Zinsser și Tang (1927) au demonstrat că virusul herpetic în contact cu oxigenul își pierde rapid virulența, iar Edwards (1932) a constatat o sensibilitate deosebită a virusului aftos la cele mai mici schimbări prin oxidare a mediului.

Aerul atmosferic. Prin oxigenul din compoziția sa, duce la creșterea proprietăților oxidante ale mediului, cu aceleași efecte negative asupra virusului aftos.

Ozonul (O_3). Puternic oxidant, cu efect rapid, se dovedește a fi un dezinfectant energic, putînd fi astfel utilizat cu eficiență la sterilizarea fecalelor și apelor de canal contaminate cu virusul poliomielitic.

4.2.2.9. *Halogenii și compușii halogenați*

Clorul. Clorul și compușii clorului prezintă un mare interes practic, întrucît ei sînt utilizați aproape universal la dezinfecția apelor potabile. Levaditi, Kling și Lépine (1961) au arătat că 4 mg/L clor într-o suspensie tulbure sterilizează virusul poliomielitic, în timp ce într-o suspensie filtrată este nevoie de numai 0,4 mg/L. Totuși, doza de 0,5 părți la un milion (cantitate superioară celei utilizate în mod obișnuit la javelizarea apei) nu distruge poliovirusul nici în 90 min.

Pentru inactivarea virusului hepatitei A, clorinarea apei de băut pînă la 15 mg/L este suficientă (cu tratarea ulterioară a apei cu bioxid de sulf sau bisulfit de sodiu în scopul reducerii excesului de clor), în timp ce, în contact direct, 1 mg/L timp de 2 min produce alterări structurale grave virusului hepatitei B, și numai 0,1 mg/L sînt necesare pentru virusul hepatitei A.

Kelly și Sanderson (1958) au stabilit apoi sensibilitatea comparativă a diferitelor virusuri enterice, polio- și nepoliomielitice, față de clorul liber, stabilind-o în următoarea ordine : virusul Coxsackie B5, poliovirusul tip 1 (Mahoney), virusul Coxsackie D1 tip II, virusurile poliomielitice tip 3 și 1 (M. K. 500).

Inactivarea virusului gripal aflat în aerul atmosferic se realizează, după Smorodințev (1953), în urma unui contact de 30—60 min, cu mici cantități de clor (5—10 mg/m^3 de aer).

Hipocloritul de calciu (clorura de var). Este utilizat pentru acțiunea virulicidă a clorului pe care îl pune în libertate. Astfel, în soluție de 0,2—0,3% hipocloritul de calciu distruge virusul gripal aflat în stare de aerosoli, în concentrație de 2% inactivează, după 15 min, virusul pestei porcine din sînge, iar suspensia 25% sterilizează materiile fecale de poliovirusuri.

Hipocloritul de sodiu. În soluție 1% este foarte activ față de virusul hepatitei A, utilizîndu-se la sterilizarea suprafețelor mari ; concentrația de 1,66% distruge virusul pestei porcine, iar virusurile neconvenționale sînt moderat sensibile pînă la concentrația de 5%.

Cloramina B (benzen-sulfoncloramina sodică). Bactericid prin gruparea sa — ClN —, cloramina în soluție de 1% distruge virusurile gripale, fiind folosită în timpul epidemiilor la spălarea podelelor și, prin pulverizare, la dezinfectarea cu aerosoli, iar în soluție de 2% — pentru inactivarea virusului poliomielitic ; în concentrații de 1—5% distruge în 1—2 ore virusul hepatitei A (recomandată a steriliza în acest mod vesela bolnavilor) și în concentrație de 20% este folosită pentru dezinfecția suprafețelor contaminate cu virusul hepatitei B. Cloramina acționează lent, eliberînd clor în soluția apoasă, este de patru ori mai bactericidă decît hipocloritul de sodiu și de 60 de ori mai activă decît fenolul.

Iodul și iodura de potasiu. Iodul 0,1% (Stokes și Henle, 1962) și iodura de potasiu 1% (Tovarnițki, 1948) distrug virusul gripal aerosolizat.

4.2.2.10. *Substanțele colorante (agenții fotodinamici)*

Acțiunea virulicidă a anumitor coloranți în asociație cu lumina a fost demonstrată, încă din 1922, de Levaditi, Harvier și Nicolau care au arătat că : *clorhidratul de parafuxină, roșul de tripan, albastrul de tripan,* dar mai ales *albastrul de metilen* distrug unele virusuri după un contact de 3 ore, la lumină. Ulterior, s-au făcut cercetări de către numeroși autori asupra acțiunii fotodinamice a altor substanțe colorante, în prezent paleta acestora fiind destul de largă.

Compușii tiazinici. Dintre compușii tiazinici, *albastrul de metilen* s-a dovedit a fi cel mai utilizat colorant pentru efectul său virulicid ; astfel, virusurile rabic, herpetic, aftos, arbovirusul Louping-Ill, precum și rickettsiile sînt rapid inactivate în prezența luminii. Soluții de albastru de metilen în diluție de 1/25 000, supuse unei lumini artificiale de 100 W, la 15 cm distanță, inactivează în 15 min virusul encefalitic (Șubladze și Ananiev, 1963) ; la diluții mai întinse, de 1/100 000, în prezența luminii albe, poliovirusul își pierde rapid puterea patogenă, iar virusul febrei galbene este distrus în 20 min. Albastrul de metilen, în concentrație de 0,2%, inhibă cultivarea tuturor speciilor de mycoplasme izolate de la om, cu excepția *Mycoplasmei pneumoniae* (Kraybill și Crawford, 1961), adăugarea acestei substanțe în concentrația amintită, în mediul lichid, permițînd selectarea tulpinilor de *M. pneumoniae*.

Coloranții acridinici. *Acridina, acriflavina* și *cloroacridina* față de virusurile gripale, poliomielitice și virusul febrei aftoase, precum și *tionina, pironina, gonacrina* și *proflavina* față de virusurile vaccinal, herpetic, al pestei aviare, encefalitei scoțiene, jigodiei, ectromeliei, febrei aftoase și al turbării au o acțiune fotoinactivantă redusă.

Derivații trifenilmetanului. Dintre derivații trifenilmetanului, *cristalul violet* inhibă virusul gripal, iar *violetul de gențiană* 1% inactivează herpesvirusul în 3 ore, la 37°C; în concentrație de 1/500 000 (nu însă și la 1/50 000, cînd este inactiv) provoacă, în 30 min, pierderea aproape totală (95—99%) a patogenității virusului herpes simplex pentru oul de găină embrionat.

Nitroderivații. *Nitroacridina* inhibă virusul meningopneumoniei și al parotiditei epidemice, iar *dinitrofenolul* 5—30 µg/mL influențează negativ virusul gripal.

Alți coloranți. *Roșul de tripan* și *albastrul de tripan* în concentrație de 1% inactivează, în asociație cu lumina, virusul herpetic în 3 ore, la 37°C, în așa fel încît acesta nu mai determină la iepure nici boala experimentală și nici imunitate locală sau generală (Levaditi, Harvier și Nicolau, 1922).

4.2.2.11. *Vitaminele*

Dintre acestea, vom aminti numai *vitamina C (acidul ascorbic)*, care are o acțiune ușor distructivă asupra virusurilor gripale și poliomielitice, cu aplicații modeste în terapia și profilaxia unor viroze. În concentrație de 1%, vitamina C are efect rabicid asupra unei suspensii nervoase, acționînd ca un puternic factor de inhibiție al polipeptidazelor (Remlinger și Bailly, 1952).

4.2.2.12. *Lactonele*

Beta-propiolactona. În concentrație de 0,2—0,4% are un efect inactivant față de majoritatea virusurilor, dintre care amintim în special adenovirusurile, virusurile rabic, encefalomielitei ecvine, gripale și al encefalitei de căpușă. Virusul rujeolic este inactivat de beta-propiolactonă (cu ajutorul căreia s-a și preparat un vaccin antirujeolic) (Brancato și colab., 1964); virusul urlian este distrus în 2 ore fără afectarea, însă, a puterii sale hemaglutinante (Polley și Guerrin, 1957), în timp ce virusurile neconvenționale sînt deosebit de rezistente la această substanță — spre deosebire de celelalte arbovirusuri (Gibbs Jr. și colab., 1978).

4.2.2.13. *Imidele*

Ureea. Are acțiune inactivantă asupra virusurilor, funcție de concentrație. Astfel, la 1 M efectul ureei asupra virusului encefalitei japoneze B este în parte reversibil în ceea ce privește denaturarea proteinelor și a structurii lor ; la concentrații cuprinse între 3—8 M, ureea distruge ireversibil particula virală, cu scăderea infectivității. În ceea ce privește virusul gripal, are loc desfacerea corpusculului viral în fragmente, cu pierderea proprietății infectante a acidului nucleic și a activității sale hemaglutinante. De asemenea, la o molaritate ridicată (6 M), virusurile neconvenționale sînt sensibile față de acest agent (De Witt Stetten și Carrigan, 1984). În general, în soluții concentrate, ureea distruge cu ușurință majoritatea virusurilor.

4.2.2.14. *Ionii metalici. Concentrația ionică*

Ionicii metalici. În afara faptului că ionii alcalini și, în mai mică măsură, ionii de cupru, zinc, fier, mangan și cobalt joacă un rol vital într-un foarte mare număr de procese biologice în care sînt implicați inframicrobii — direct sau indirect —, ionii metalici, cationii de magneziu (Mg^{2+}) și calciu (Ca^{2+}) inactivează unele virusuri, cum sînt arbovirusurile de grup A, Sindbis și de grup B, virusul encefalitei japoneze B (Melnick, 1962). Dimpotrivă, concentrațiile sporite de ioni de magneziu, în mediul în care se recoltează șarjele de vaccin rujeolic, stabilizează infectivitatea virusului și au un efect restrictiv asupra unor eventuali agenți contaminanți ai substratului. De asemenea, influențează negativ infectivitatea enterovirusurilor și nu au nici un efect asupra rhinovirusurilor ecvine. Ionii de calciu au fost implicați și ei în acest proces, Schmidt și Rasmussen descriind în 1952 efectul lor inhibitor asupra virusului gripal. În 1959, Nicolau și colab. au utilizat cationii de argint (Ag^{+}) în inactivarea virusului rabic fix și transformarea acestuia în vaccin antirabic. Bazîndu-se pe datele experimentale ale lui Duca și colab., care au preparat un vaccin antirabic electrodinizat cu ajutorul argintului, Nicolau și colab. au simplificat metodologia de atenuare a virusului rabic fix prin tratarea suspensiei apoase de virus „argintat“ (suspensie rabică virulentă 0,15% azotat de argint) cu soluție de clorură de sodiu 18‰, obținînd un vaccin antirabic eficace, comparabil ca putere imunizantă cu cel preparat prin alte tehnologii. În sfîrșit, aceiași autori au utilizat capacitatea de inactivare a ionilor de cupru (Cu^{2+}) (azotat de cupru 0,6‰ sau clorură de cupru 0,5‰), obținînd vaccinuri cu o putere imunizantă asemănătoare cu vaccinul argintat.

Apa ionizată. Are un efect inactivant asupra unor virusuri ; astfel, obținută prin trecerea prin apă, timp de 2 min, a unui curent electric continuu între doi electrozi de argint, apa ionizată inactivează în 24 de ore virusul rabic fix, pentru minimum 60—125 de zile (Nicolau, 1956).

Variațiile în concentrațiile ionice ale mediului în care se găsesc virusurile pot influența stabilitatea lor.

Soluția izotonică de NaCl. Diminuează incontestabil rezistența virusurilor la acțiunea factorilor de mediu ; astfel, soluția de NaCl (0,1 M și 1 M) inactivează virusul encefalitei japoneze B iar soluțiile saline normale distrug virusul rabic în cîteva ore. Pentru a preveni acțiunea virulicidă a soluției izotonice cloruro-sodice, se recomandă diluții de ser normal de cal sau bou 10% în apă distilată, care permit conservarea virulenței diluțiilor timp de cîteva zile (Milam, 1956). Virusul encefalomielitei ecvine își pierde, de asemenea, infectivitatea foarte repede în soluțiile fiziologice, în timp ce în soluția Ringer rămîne stabil timp de cîteva săptămîni.

4.2.2.15. *pH-ul*

Soluțiile apoase obținute din electroliți (substanțe care prin dizolvare se disociază) conțin, în afară de săruri dizolvate și ioni legați, și ioni liberi de H^+ și OH^- în concentrație totală de 10^{-14}. Soluțiile se consideră neutre (10^{-7}) cînd concentrația este egală în ioni H^+ și OH^-, conținînd 1,008 g H^+ în 10 milioane L. Indicii negativi fiind incomozi în calcule, s-a introdus noțiunea de indice de hidrogen, pH-ul, logaritm cu semn schimbat al concentrației ionilor de hidrogen.

Mărimea pH-ului, determinată prin metode colorimetrice sau electrometrice, are o mare semnificație, nu numai pentru procesele chimice petrecute în soluție, ci și pentru procesele biologice. Dintre acestea menționăm ca esențială valoarea pH-ului în fenomenele de filtrare, adsorbție, eluție și deci de purificare a virusurilor, în conservarea acestora prin stocare (în care cunoașterea și utilizarea pH-ului optim, a zonei de stabilitate la pH, este capitală). Scăderea sau creșterea pH-ului față de valoarea optimă a concentrației în ioni de hidrogen influențează activitatea patogenă a virusurilor. Odată pierdută capacitatea patogenă în lichidele cu un pH incompatibil viabilității lor, acestea nu mai pot fi reactivate, sînt ireversibil pierdute.

Din tabelul 4-V se constată că valorile pH-ului optim sînt cuprinse în majoritate în zona neutră și acidă, numai cîteva virusuri preferînd mediile alcaline (arbovirusurile, virusul gripal B). Singur virusul febrei aftoase se află numai la pH neutru în zona sa de stabilitate de care, îndepărtîndu-se, este repede distrus.

TABELUL 4-V

Zona de stabilitate a virusurilor

pH	Virusul	pH	Virusul
3–4	poliomielitic	6	Blue Tongue
3–10	hepatitei A	6–9,5	adeno
3,5–7,9	papilomului iepurelui	6,4–7	rabic
4–11	bolii Teschen	6,5–7	gripal A
4–12	sarcomului Rous al găinii	6,5–8,5	urlian
4,4–10,5	rujeolic	6,9–7,2	amaril
4,6–4,8	herpes simplex	7,2–7,9	febrei aftoase
5–5,5	pestei porcine	7,3–10	encefalomielitei ecvine de est
5–9	ectromeliei	7,5–9,5	encefalitei japoneze B
5,4–8,8	vaccinal	7,6–8,2	encefalitei de căpușă
5,5–7,5	bolii Newcastle	7,9–9	gripal B
5,6–7,4	bolii Borna	8,4–8,8	encefalitei de St. Louis

Mai trebuie remarcat că enterovirusurile sînt dotate cu o rezistență deosebită chiar la pH 1-3, nefiind distruse la pH-ul foarte acid al conținutului stomacal, ceea ce permite multiplicarea lor în celulele epiteliului intestinal. În schimb, virusul febrei aftoase este foarte sensibil și este inactivat chiar și la pH 6.

Unele virusuri, așa cum rezultă din tabelul 4-V, au o zonă întinsă de stabilitate (pH 3-10 pentru virusul hepatitei de tip A), altele însă foarte restrînsă (pH 4,6—4,8 pentru virusul herpes simplex, pH 5—5,5 pentru virusul pestei porcine), iar togavirusurile au de suferit chiar și la variații foarte mici de pH, capacitatea lor hemaglutinantă fiind rapid anihilată.

4.2.3. AGENȚII BIOLOGICI

Sînt organisme, substanțe organice sau produse de origine animală sau vegetală, cu scăzută valoare virulicidă sau, dimpotrivă, conservantă, de multe ori acționînd sinergic cu factorii de mediu.

4.2.3.1. *Simbioza virusurilor*

Virusurile rabic, herpetic și neurovaccinal, în contact cu *Glaucoma piriformis* ori cu *Strigomonas oncopelti,* nu se multiplică, ceea ce dovedește, o dată în plus, că virusurile — deși paraziți obligatorii ai celulelor vii — au totuși nevoie de anumite celule care să le ofere mediul necesar de cultură.

Simbioza cu levuri vii. Suspensia de țesut nervos infectat cu virus rabic, însămînțată în bulion cu levuri, furnizează subculturi care s-au dovedit virulente pentru iepure pe cale intracerebrală, pînă la a 11-a trecere. Virusul rabic pare să fie adsorbit de levuri și transmis ulterior la mai multe generații, care continuă să rămînă virulente chiar după ce levurile au fost cultivate pe geloză simplă (Isabolinski și colab., 1935).

Simbioza virală. Din numeroasele comunicări făcute de Belin (1925, 1926) rezultă că virusul febrei aftoase, cultivat pe organismele sensibile în simbioză cu virusul vaccinal, se multiplică în prezența acestuia și se atenuează după ce ambele virusuri au evoluat un anumit timp împreună. Ca urmare, pentru vaccinarea bovinelor, Belin recomandă vaccinul complex vaccino-aftos, în care virusul febrei aftoase se găsește sub o formă atenuată. Fără a nega posibilitatea atenuării virusului prin cultivarea lui în simbioză cu un altul, vaccinul nu s-a impus, specialiștii considerînd folosirea sa cu totul nesigură.

4.2.3.2. *Oul embrionat*

Metoda de cultivare a virusurilor în oul embrionat s-a generalizat rapid, fiind aplicată la numeroase virusuri din patologia umană și animală.

Oul embrionat nu constituie însă o gazdă ideală pentru replicarea unor virusuri, cum este virusul rabic, tulpina avianizată Flury suferind modificări importante prin treceri succesive *in ovo;* este încă patogenă în administrarea intracerebrală la cobai și șoarece, dar devine puțin virulentă pentru iepure. În ceea ce privește calea intraperitoneală, tulpina cultivată *in ovo* pare să-și fi pierdut, în mod treptat și pe măsura trecerilor în serie în sacul vitelin, capacitatea sa rabigenă, pentru a deveni ulterior complet apatogenă. Tulpina Flury, cultivată în sacul vitelin și adaptată la embrionul de găină, a devenit slab patogenă pentru calea nervoasă și absolut inofensivă pentru cîinele inoculat în mușchii maseteri. La a 180-a trecere pe oul embrionat, tulpina a încetat să mai fie virulentă pentru șoarecele adult și pentru iepure, inoculați intracerebral, păstrîndu-și însă calitățile antigenice. Tulpina astfel atenuată *in ovo* a fost utilizată, fără nici o altă modificare cu vreun agent fizic sau chimic, în vaccinarea cîinelui.

4.2.3.3. *Culturile de celule*

Cultivate în afara organismului animal sau aviar, în condiții cît mai apropiate de cele *in vivo*, culturile de celule sînt utilizate în prezent pe scară largă pentru diagnosticul și cercetările virusologice, precum și ca substrat pentru prepararea unor vaccinuri.

În cursul pasajelor pe culturile celulare, virusurile își păstrează — în general — caracterele morfologice și biologice, dar, în anumite cazuri, virusurile trebuie să se adapteze unor condiții diferite de cele naturale pentru a se putea cultiva și multiplica.

În cazul unor virusuri care nu-și evidențiază prin nimic prezența în cultură, sînt necesare „pasaje oarbe“ de adaptare, prin care virusul va deveni apt de inițiere a ciclului productiv, cu apariția efectelor specifice (ca în cazul virusurilor respiratorii, unele enterovirusuri nepoliomielitice etc.). În unele infecții virale fruste, virusul nu poate fi decelat din mediul de cultură de la primul pasaj, ci numai prin ruperea celulelor, ca în cazul virusului varicella-zoster (Sohier, 1964).

Dintre cazurile mai particulare, în care culturile de celule au o influență asupra unor virusuri, citām exaltarea efectului citopatic al unui virus slab citopatogen în cultura contaminată cu un virus necitopatogen, producerea de hibridizări de acizi nucleici omologi virali etc.

4.2.3.4. *Organismul animal*

Atenuarea virulenței inframicrobilor prin folosirea diferitelor procedee biologice n-a dat, în general, rezultate remarcabile. Prin adaptarea virusului la alte specii animale nu s-a obținut, decît arareori, o disociere a proprietăților patogene de cele imunogene, deci tulpini cu caractere stabile, avirulente pentru speciile receptive, dar în schimb, puternic imunogene.

Animalul de experiență. Prin vaccinarea bovinelor cu un virus aftos întreținut pe cobai și considerat atenuat, Vallée și colab. (1932) nu au obținut rezultate concordante, un singur pasaj pe bovine fiind suficient, de altfel, spre a reda virusului activitatea sa primară. După numeroase pasaje pe cobai însă, Sviridov (1953) a obținut un virus nou, care nu induce infecția la bovine, fiind deci avirulent pentru această specie, conferind însă o imunitate puternică atît față de infecția naturală, cît și experimentală.

Adaptarea virusului febrei aftoase la iepurele tînăr, obținută de Gribanov (1955), a fost parțial încununată de succes, autorul realizînd pasaje în serie pe această specie, însă, după 30—40 de treceri, virusul își păstra specificitatea de tip imunologic, cît și patogenitatea pentru cobai, bovine și porcine. Henderson și Cunha (1959) au reușit să adapteze virusul febrei aftoase pe iepuri tineri și să experimenteze vaccinarea cu virus viu modificat (vaccin lapinizat), metodă care, ulterior, a căpătat o largă răspîndire, permițînd a spera în viitor la obținerea de tulpini de virus vii, avirulente pentru speciile receptive și bune imunogene.

Tumorile animale. Inocularea virusurilor în tumori are drept urmare, în unele cazuri, transformarea caracterelor biologice ale virusului inițial. Astfel, încercările de cultură a virusului rabic de stradă în tumori (tumora lui Pearce) la iepure, întreprinse de Levaditi și Schöen (1936) și soldate cu apariția corpilor Babeș-Negri în citoplasma celulelor tumorale, au dus, prin treceri succesive, la dispariția potențialului proliferativ al tumorii infectate cu virusul rabic, pe cînd la martori, tumora necontaminată cu acest virus se dezvolta normal.

Virusul rabic de stradă inoculat subcutanat la șobolani, cărori li s-a grefat cu 3 zile avans sarcomul șobolanilor, a indus un virus cu caractere biologice, morfologice și serologice asemănătoare unui virus fix, cu antigenicitate ridicată.

Virusul encefalitei ruse de Extrem Orient nu-și pierde neurotropismul său prin treceri sucesive pe sarcomul Crocker 180, dar dobîndește o creștere intensă a proprietăților sale oncolitice (Moore, 1951). Același autor a mai realizat, de asemenea, adaptarea aceluiași virus prin treceri în serie în sarcomul osteogenetic Wagner, virusul dobîndind calități oncolitice foarte intense, pe care nu le manifesta față de tumoră la începutul experienței.

În Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau“, Isaia și colab .(1965) au obținut progeni (AE1 și AE2) total diferiți de adenovirusul de tip 3 (virus relativ rezistent) care fusese inoculat la șoarecele cu tumora ascitică Ehrlich, fiind probabil tulpini de adenovirusuri modificate, cărora li s-a conferit o sensibilitate mai mare la temperatura de 37°C și la radiațiile ultraviolete. Autorii pledează pentru ipoteza că acizii nucleici ar fi responsabili de modificările proprietăților incriminate. Mai adăugăm că adaptarea *in vitro* a virusului bolii Newcastle la celulele carcinomului Ehrlich intensifică acțiunea necrozantă a virusului față de carcinomul ascitic *in vivo* (Nicolau și Cajal, 1957), iar trecerile virusului West Nile *in vitro*, pe celule tumorale, au făcut ca acest virus să devină foarte necrozant față de aceste celule (Nicolau și Nastac, 1968).

4.2.3.5. *Secrețiile organismelor uman și animal*

Laptele. Dacă acțiunea laptelui de vacă asupra virusului pestei porcine mai este controversată, în cazul altor virusuri este bine stabilit că are un efect conservant. Astfel, virusul poliomielitic, distrus de acțiunea căldurii atunci cînd este suspendat în apă sau ser fiziologic, este protejat pentru un timp dacă este suspendat în lapte. Patogenitatea acestui virus încorporat în lapte se manifestă doar cîteva zile la temperatura ambiantă (deoarece laptele se acidifiază), dar se păstrează în cele mai bune condiții timp de 91 de zile la —2°C (Kling și colab., 1931).

Virusul aftos, de asemenea, supraviețuiește în lapte 7—9 zile, la 18°C, și rezistă pînă la 47 de zile în laptele sterilizat și apoi refrigerat la 4°C (Galloway, 1932). După Levaditi, Harvier și Nicolau (1921), virusul herpetic rezistă 15 zile în apă sterilizată, dar menținut în laptele de vacă își conservă virulența timp de 96 de zile, iar în laptele degresat, păstrat la 4°C, se obține o bună conservare a virusului timp de un an.

Secrețiile cutanate. Au un rol cert inactivant asupra virusurilor. Virusul gripal este inactivat în 10 min în contact cu pielea (Parker și Mc Neal, 1944). Pe de altă parte, după Phisalix (1915), iepurele poate fi imunizat contra turbării dacă este tratat cu secreție cutanată provenind de la diferiți batracieni și cu venin încălzit de viperă.

Secreția nazală. Are o acțiune net virulicidă, pusă în evidență pentru prima dată de Burnet și colab. (1939) sub denumirea de „agentul inactivant al virusului". Obținut prin recoltarea pe tampoane introduse în cavitatea nazală la subiecții în perfectă stare de sănătate, acesta exercită un efect inactivant asupra diferitelor tulpini de virus gripal, inclusiv cea porcină, dar slab inactivant asupra virusului poliomielitic.

Secrețiile lacrimală și salivară. Aceste secreții conțin *lizozimul,* proteină alcătuită dintr-un singur lanț polipeptidic, format din 129 de aminoacizi, ce posedă un peptid care constituie un determinant antigenic conformațional al moleculei, contribuind la fixarea complementului IgA. Lizozimul se găsește în secreții (lacrimi, salivă), dar și în serul sanguin, avînd acțiuni bactericide și litice asupra unor microorganisme și un rol însemnat în procesul de inactivare a virusurilor în perioada de circulație a acestora prin sînge și umori (Davis și colab., 1972).

Sucul gastric. Are o capacitate virulicidă ridicată, datorită pH-ului său puternic acid, constituind o adevărată barieră a activității stomacale. Astfel, virusul poliomielitic este inactivat parțial în 5 min și total în 15 min, supus acțiunii sucului gastric cu pH 1,5 ; la pH 2, inactivarea începe după 2 ore și este completă după 4 ore, iar la pH 3—4, sucul gastric nu mai exercită nici o acțiune virulicidă asupra sa. Poliovirusul ajuns în stomac poate deci să rămînă neatins, să treacă apoi în intestin și să fie eliminat sub forma sa activă (Barski și colab., 1954). Dimpotrivă, conform datelor furnizate de Bailly (1945), sucul gastric distruge virusul rabic, *in vitro,* în cîteva ore.

Bila. Bila în contact cu virusurile, fie le inactivează, distrugîndu-le, fie formează un complex virus — bilă capabil să se disocieze în organism și să provoace infecții ușoare sau inaparente (Ronse, 1935). Ea inactivează în cîteva minute de contact virusurile rabic, herpetic, gripal și vaccinal și în 24 de ore, la 37°C, sau în 3 zile, la 18—20°C, virusul aftos, poliovirusul rezistînd la acțiunea bilei (Levaditi și Lépine, 1948).

4.2.3.6. *Enzimele proteolitice*

Substanțe organice naturale, cu structură proteică, prezente în celulele vii sau în secrețiile acestora, enzimele au un rol catalitic în diferite reacții biochimice.

Dintre acestea, enzimele proteolitice — extracte chimic pure sau cristalizate din diverse țesuturi sau organe animale (pancreas, timus, tiroidă, splină, testicul, cec, leucocite etc.) —, al căror principiu activ este *tripsina, chimotripsina, pepsina, papaina, ptialina, lipaza, proteinaza K* etc., hidrolizează („digeră“) învelișul proteic viral, facilitînd intervenția nucleazelor, care sînt de fapt responsabile de inactivarea propriu-zisă, lizatele virale rămînînd de regulă neimunogene. Dintre toate enzimele proteolitice ne vom referi numai la cea mai reprezentativă, *tripsina.* Ea inactivează arbovirusurile de grup B, virusurile Aujeszky, encefalomielitei cailor, febrei aftoase, pestei porcine, determină abolirea infectivității virusului rujeolic într-o oră la 45°C cu scăderea notabilă a antigenicității (Machlowitz și colab., 1961), distruge virulența suspensiei cerebrale rabice după 24 de ore de contact la 10—12°C, inactivează parțial virusul urlian aflat în contact 18 ore la 37°C. Tripsina nu exercită însă nici o acțiune asupra patogenității virusurilor herpes simplex (Amos, 1953), poliomielitic, NDV, pestei aviare, enterovirusurilor bovine și porcine, precum și asupra arbovirusurilor neconvenționale.

4.2.3.7. *Propolisul (ceara neagră)*

Produs natural, originar din polenul și rășinile de plante prelucrate de albine, propolisul 10%, obținut prin refluxare timp de 10 ore, a fost utilizat cu succes de Crișan și colab. (1976), în Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau“, la reducerea infectivității virusului herpes simplex. Diluat 5% în apă distilată și pus în contact 24 de ore cu o suspensie de virus herpetic, propolisul reduce cu 2—3 log titrul infectant, în 7—10 zile, și, asemănător, numărul de plaje.

Împreună cu Morfei și Crișan, în 1977, am constatat prin RIA că, în contact cu virusul hepatitei A, propolisul are o acțiune asemănătoare cu dezinfectantele curente de tipul cloraminei B și bromurii de etilpirimidină (bromocet) asupra antigenului de suprafață al acestui virus.

4.2.3.8. *Extractele de plante*

Sucurile de origine vegetală, cum este sucul de *Agave americana* și latexul de *Ficus carica,* ce conțin o diastază proteolitică, au o capacitate rabicidă netă (Remlinger și Bailly, 1947). Extractul din planta *Celvatia giganteea* are o acțiune cu caracter inhibitor specific față de virusurile ECHO 1, 9, 11 și 14 (Goulet și colab., 1960).

4.2.3.9. *Putrefacția și autoliza cadaverică*

În cadavrele care nu sînt supuse nici unui proces de conservare, fenomenele de putrefacție sau autoliză cadaverică care au loc în intimitatea țesuturilor pe care le degradează au acțiune distructivă și asupra virusurilor, mai mult sau mai puțin rapidă, funcție de condițiile mediului ambiant. Acest proces de degradare se extinde mai greu la măduva osoasă, fapt pentru care aceasta se menţine infectantă un timp mai îndelungat. Instalarea rigidităţii cadaverice, care este însoţită de o reacţie acidă, schimbarea pH-ului în ţesuturile moarte, oxidarea în mediul umed şi la temperatură disgenetică atenuează acţiunea patogenă a germenilor şi o face să dispară în scurt timp.

Durata de supravieţuire a virusului în cadavre este variabilă, dependentă de virus, de organ şi de condiţiile de mediu (în special de temperatură). Dacă în creierul de iepure mort de nevraxită herpetică, menţinut la temperatura laboratorului, se constată că autoliza cadaverică respectă virulenţa germenului doar 48 de ore, virusul pestos porcin se menţine viabil 3—4 zile în organele putrefiate şi 3—15 zile în măduva osoasă, virusul aftos rezistă 21 de zile în cadavrele de cobai infectate, 35 de zile în sînge, 20—53 de zile în rinichi şi pînă la 76 de zile în măduva osoasă.

Cercetările întreprinse în acest domeniu, încă din 1888, de către Galtier, au arătat că virusul rabic se conservă 5 săptămîni în cadavrele înhumate, putînd fi recuperat din cadavrele putrefiate prin filtrare, iar, mai recent, prin tratarea cu antibiotice a probelor. În autoliza cadaverică, neuronii sînt lizaţi şi dispar. Creierul cîinilor infectat cu virus rabic rezistă mai multă vreme la autoliză decît creierul normal, rezistenţa părînd a se datora unei acţiuni inhibitoare exercitate de virus asupra fermenţilor autolitici.

4.3. INHIBITORII SELECTIVI AI REPLICĂRII VIRALE

Virusurile, acele pachete de acid nucleic infectant înconjurate de un înveliş proteic protector, deşi aflate pe treapta cea mai de jos a ierarhiei vieţii, sînt structurile cele mai eficiente de autoreproducere intracelulară, a căror patogenitate intră în interacţiune cu substanţa celulei cu o rată foarte rapidă de replicare. După penetrarea celulei de către virusul patogen, întreaga capacitate energetică şi funcţională a celulei este pusă în slujba virusului agresor, urmată de expulzia produsului complet din celula autodistrusă şi de invazia altor celule susceptibile învecinate, realizîndu-se astfel un nou ciclu de replicare.

Marea varietate a celulelor bacteriene şi mamifere parazitate, care diferă considerabil între ele din punct de vedere metabolic, condiţionează tropismul acestor inframicroorganisme pentru anumite celule şi topografii celulare, virusurile rămînînd dependente prin replicarea lor de procesele biosintetice ale celulei-gazdă. Această dependenţă sugerează limitele posibilităţilor noastre de a bloca sinteza virală fără a leza grav şi celula-gazdă şi explică rezultatele slabe obţinute pînă acum în acest domeniu. Într-adevăr, în comparaţie cu succesele vaccinării specifice, care are un istoric de aproape două secole (iniţiată de epocala descoperire a lui Jenner, care prin inocularea variolei vacilor la om obţinea o imunitate puternică faţă de variola umană), cele ale chimioterapiei antivirale sînt modeste, cunoscîndu-se azi, după 30 de ani de cercetări intensive, numai cîteva droguri cu activitate profilactică și/sau terapeutică doar asupra infecțiilor cu virusurile variolic, herpetic și gripal, pentru celelalte virusuri nefiind cunoscuți inhibitori specifici.

În teorie, un inhibitor viral specific se poate complexa fie cu o componentă a învelișului viral și în acest fel interferează cu adsorbția, penetrarea sau învelirea particulei virale, fie cu materialul genetic, prevenind transcripția sau translația informației genetice. O altă posibilitate este aceea că un inhibitor poate într-un fel să blocheze sau să întrerupă sinteza proteinelor funcționale, prevenind asocierea subunităților enzimei (monomerii). În final, un inhibitor specific se poate combina cu o proteină virală sintetizată, împiedicînd funcția ei enzimatică sau structurală. Problema cea grea este de a găsi compuși chimici care pot recunoaște selectiv caracteristicile specific virale ale structurii fine a macromoleculelor virale sau codificate de virus.

Deoarece baza specifică exactă a specificității acidului nucleic viral și a proteinelor virale nu este cunoscută, nu este posibil a aprecia, pe o bază teoretică precisă, cerințele structurale ale inhibitorilor specifici pentru fiecare virus în parte. Definirea structurii tridimensionale a moleculelor de importanță biologică și locurile lor reactive constituie una dintre problemele biologiei moderne.

4.3.1. PREVENTIVI AI ADSORBȚIEI ȘI PENETRĂRII VIRALE

4.3.1.1. *Compuși chimici cu greutate moleculară mică*

Adamantina. Au fost testate mii de molecule, însă pînă astăzi numai o singură clasă de compuși s-a dovedit de utilitate neîndoielnică în prevenirea gripei la om. În 1954, Ackermann și Maasab au găsit că acidul *α-amino-p-metoxifenilmetansulfonic* interferează cu penetrarea și expulzarea virusului gripal din celula-gazdă, dar specificitatea acțiunii sale nu a putut fi determinată. Un deceniu mai tîrziu însă, Jackson și colab. (1963), confirmați în 1964 de Davies și colab. și Hoffman și colab., au descoperit un inhibitor de o cu totul altă natură chimică, cu efect specific asupra stadiului timpuriu al procesului de infecție celulară cu myxovirusuri, *1-adamantanamina hidroclorică (Symmetrel)*. Ca mod de acțiune, pare clar că adamantina interferează cu o fază de început a interacțiunii virus—celulă, blocînd trancripția primară, numai dacă drogul era pătruns în celulă în momentul infecției (Maasab și Cochran, 1964).

Rimantadina (l-adamantanmetilamina ; α-metil-l-adamantanmetilamina. Derivat al adamantinei, rimantadina a căpătat o mai largă aplicație clinică decît aceasta, fiind utilizată în tratamentul gripei A (H1N1), dar ineficientă contra gripei B (Blinger și colab., 1970). În ciuda progresului făcut în terapia antivirală cu acest drog, problema mecanismului său de acțiune nu a fost pe deplin rezolvată. Unele date atestă că trancripția primară este ținta activității antivirale a rimantadinei, și anume gena 7 (codificînd pentru proteina M) care este însă responsabilă pentru rezistența virusurilor gripale la adamantină (Lubeck și colab., 1978).

4.3.1.2. *Substanțe cu greutate moleculară mare, de origine biologică*

Anticorpii specifici. Prin complexare cu o componentă de suprafață critică a corpusculului viral infectant, anticorpii specifici redau neinfectantă particula virală, la o rată rapidă. O particulă virală care a adsorbit o singură moleculă de anticorp poate fi totuși capabilă de a ataca suprafața celulei. Se pare că, la o multiplicitate crescută de anticorpi, capacitatea complexelor virus-anticorp de a se adsorbi pe suprafața celulei este diminuată. Mecanismul exact prin care anticorpii specifici previn infecția nu este complet înțeles, dar procesul de atașare precoce poate fi implicat. Anticorpii neutralizanți nu alterează cinetica proceselor replicative virale odată ce infecția s-a declanșat, deoarece — probabil — anticorpii nu pot penetra celulele-gazdă.

Properdina. Descoperită și izolată în stare pură sub formă de euglobulină de către Pillemer (1954), properdina este o albumină serică din fracțiunea a treia a complementului (C_3^1). Spre deosebire de reacția antigen-anticorp, properdina nu distruge fracțiunea de complement în prezența căreia este activă.

Wedgood și colab. (1956) identifică properdina cu inhibitorii naturali activi față de virusurile gripal și al bolii Newcastle, iar alți cercetători admit identitatea properdinei cu anticorpii naturali existenți în serul uman și al animalelor, deoarece ambele produse sînt legate de fracția globulinică din ser. Numeroase lucrări s-au ocupat de acțiunea sa, care se integrează în mecanismele nespecifice ale rezistenței. În timp ce majoritatea autorilor sînt de acord cu acțiunea antimicrobiană nespecifică a properdinei, există puține lucrări și suficiente controverse în privința acțiunii sale antivirale. Volinskaia și colab. (1959) arată că sistemul properdinic existent în serul cornutelor mari are acțiune neutralizantă asupra unor virusuri, între care și adenovirusurile; îndepărtarea din ser a properdinei suprimă acest efect, iar adaosul ei îl restabilește. Se consideră că rezistența obținută prin administrarea vaccinurilor preparate cu virusuri omorîte se datorește creșterii properdinei serice. Rolul antiinfecțios al properdinei reiese, după Konikov și Gekker (1960), pe de o parte, din scăderea sa pronunțată în cazurile de îmbolnăvire care au o evoluție gravă iar, pe de altă parte, în creșterea sa în cazurile cu evoluție benignă, ca spre exemplu în hepatita virală (Janczura și Jdanovska, 1958). Această ipoteză a fost confirmată de noi (Cajal, Burducea și Andreescu, 1961) prin demonstrarea că sub acțiunea radiațiilor X, ca și în cazul radiațiilor β și γ emise de ^{32}P și respectiv ^{131}I (Cajal și colab., 1959; Burducea și colab., 1961), conținutul în properdină scade semnificativ, fapt ce conduce la diminuarea rezistenței nespecifice antivirale și la bacteriemii.

Ceruloplasmina. Componentă serică normală la o concentrație de aproximativ 35 mg/mL ser, ceruloplasmina (Cer) este o metaloglicoproteină ce conține cupru în ambele stări de valență, cu proprietăți oxidoreducătoare. Prin studii aprofundate asupra intervenției ceruloplasminei în infecțiile cu myxovirusuri și paramyxovirusuri, Tomas și colab. (1985), în Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau", au evidențiat două mecanisme de acțiune posibile ale acestei componente. Primul se realizează pe calea interacțiunii glicoproteină-glicoproteină dintre ceruloplasmină și hemaglutinină [HA(V)] — neuraminidază virală [NA(V)], conform reacțiilor :

1. $Cer + HA(V) \rightarrow [Cer.HA(V)]$

2. $$\begin{array}{l} CER + NA(V) \rightarrow [Cer.NA(V)] \rightarrow NA(V) + AsCer \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad \downarrow \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad AsCer + HA(V) \rightarrow [AsCer.HA(V)] \end{array}$$

ceea ce duce la apariția unui complex asialo-ceruloplasmină (AsCer), urmat de diminurea numărului de corpusculi infectanți din inocul și la blocarea progenilor în faza de expulzie a virusului din celula-gazdă. În acest fel, ceruloplasmina exercită un rol de „capcană“ asupra corpusculilor virali, nemaipermițînd adsorbția lor pe celula-gazdă. Al doilea mecanism se adresează captării radicalilor O_2^-, în care sînt implicate fie HA la myxovirusuri, fie factorul de fuziune (F) în cazul paramyxovirusurilor. Ca rezultat al celor două efecte, funcție de raportul concentrațiilor virus-ceruloplasmină, infecția virală este diminuată sau abolită.

Mucoproteinele. *Inhibitorii serici.* Unele virusuri sînt neutralizate de componente serice, altele decît anticorpii, avînd în plus (sau numai) o activitate hemaglutinoinhibantă. Este preferabil deci a considera inhibitorii serici ca entități chimice posedînd caracteristici identificabile. Cea mai înaltă activitate antivirală a inhibitorilor serici este asociată cu componentele care au mobilitatea electroforetică a α-globulinelor (α_1 și α_2), albuminelor sau β-globulinelor.

Inhibitorii urinari. Unele virusuri sînt inhibate de componente ale urinei. Mucoproteina din urină, substrat specific pentru neuraminidază, reduce infectivitatea virusurilor gripale (Tamm și Horsfall Jr., 1952), virusul complexat nemaiputînd ataca sau penetra celulele.

Alți inhibitori mucoproteici. Inhibitori ai virusurilor gripale mai sînt prezenți în lacrimi, secreții nazale și spută, și pot fi izolați sub formă purificată în glandele salivare și secrețiile lor (Gottschalk și colab., 1960). Inhibitorii picornavirusurilor sînt prezenți în tractul intestinal al omului și animalelor, iar o mucopolizaharidă izolată din țesutul intestinal al șoarecelui se combină specific cu virusul encefalomielitei Theler și prin aceasta previne infecția celulelor (Mandel, 1957).

4.3.2. INHIBITORII REPLICĂRII INTRACELULARE A VIRUSURILOR

4.3.2.1. *Compuși chimici cu greutate moleculară mică*

Rezultatele obținute cu inhibitori selectivi asupra replicării intracelulare virale au stabilit că sinteza proteinelor codificate de virus poate fi selectiv blocată (Tamm și Eggers, 1963).

HBB (hidroxibenzilbenzimidazolul ; 2-β-hidroxibenzilbenzimidazol). Inhibă replicarea unor enterovirusuri. Procesul inhibitor al HBB începe la mijlocul perioadei latente de replicare a picornavirusurilor și se continuă în perioada de replicare exponențială (Eggers și Tamm, 1962). HBB inhibă specific formarea, în celula infectată cu virus (în special Coxsackie B și ECHO), a ARN polimerazei virale (Baltimore și colab., 1963), enzimă ce catalizează sinteza ARN viral.

Guanidina (guanidina hidroclorică). Inhibă selectiv replicarea picornavirusurilor, mai activă fiind față de poliovirusuri. Ca și HBB, guanidina nu interferează cu adsorbția și penetrarea virusului în celulă, dar previne formarea în celula infectată cu virus a ARN polimerazei virale, a ARN viral și a proteinelor de înveliș (Baltimore și colab., 1963).

Prin urmare, mecanismul de acțiune al guanidinei și al HBB se aseamănă, el este sinergic (ca în cazul virusului Coxsackie A9), avînd un efect sporit față de administrarea unui singur drog și la concentrații echivalente. În ciuda efectelor lor marcante *in vitro,* nici unul dintre cele două nu a demonstrat calități pentru aplicarea practică ca agent chimioterapic, datorită emergenței rapide a mutantelor virale rezistente, virusurile putînd face astfel o mutație către dependența de aceste droguri.

Isatin-β-tiosemicarbazona. Inhibă replicarea poxvirusurilor, dar nu și a altor virusuri ce conțin ADN. Acest compus nu reduce sinteza ADN, ARN sau a proteinelor timpurii. Inhibă însă selectiv sinteza proteinelor structurale virale tîrzii, provocînd o schimbare a ARNm viral tîrziu după sinteza lor, prevenind astfel complexarea lor cu ribozomii pentru formarea poliribozomilor, împiedicînd asamblarea particulelor virale. Drogul este capabil a opri producerea virusului infectant la orice moment în timpul ciclului de replicare virală, realizîndu-se însă particule virale neinfectante, forme imature virale (Easterbrook, 1962). β-tiosemicarbazonele sînt de utilitate practică considerabilă, iar unul dintre cele mai active — *N-metilisatin-β-tiosemicarbazona* — este citat ca avînd un succes profilactic impresionant în profilaxia variolei umane.

4.3.2.2. *Analogi structurali ai metaboliților naturali (antimetaboliți, inhibitori metabolici)*

Sînt derivați halogenați ai dezoxiuridinei, dezoxicitidinei și guaninei. Antimetaboliții sînt denumiți și analogi, deoarece au o structură apropiată de unii metaboliți esențiali pentru celulă și sînt capabili să contracareze acțiunea acestora. Ei intervin în prima etapă a reacțiilor enzimatice blocînd substratul și implicit interacțiunea dintre metaboliții celulari și virus, astfel că sinteza nucleoproteinei virale nu mai are loc. Atomul de hidrogen în poziția 5 a uracilului, dacă este substituit prin halogeni, conduce la formarea de 5-fluorouracil, 5-bromouracil și 5-iodouracil. Derivații dezoxiribozilici ai acestor compuși (spre exemplu, dezoxinucleozidele) sînt luați de celule și, după fosforilarea 5′-monofosfaților de către timidinkinază, interferează cu sinteza ADN normal și deci cu dezvoltarea virusurilor ADN, producînd uneori sinteza particulelor virale neinfectante, goale.

Compușii uridinei. *Ftorafur* [1-(2-*tetrahidrofuril*)-5-*fluorouracil*]. Este un analog substituent al tetrahidrofuranului ; este lent convertit metabolic în 5-fluorouracil.

Fluorouracil (5-FU, 5-fluorouracil). Prin conversie în compuși fosforilați, 5-fluorodezoxiuridina-5′-monofosfat (5-dUMP) și 5-fluorouridintrifosfat (5-FUTP) inhibă timidilatsintetaza și sinteza ADN. Metabolitul 5-UTP este încorporat în ARN și astfel alterează funcțiile și procesarea ARN (Eisenbrand și colab., 1984); 5-FU interferează și sinteza ADN și ARN prin inhibarea metilării acidului dezoxiuridilic în acid timidilic.

FDU (5-fluoro-2′-dezoxiuridina). Inhibă multiplicarea virusurilor ADN (adeno, herpes simplex și citomegalic). FDU are acțiune inhibitoare, deoarece 5′-monofosfatul ei inhibă sinteza acidului timidilic, stopînd astfel sinteza ADN prin lipsa de timidintrifosfat (Cohen și colab., 1958).

BDU (5-bromo-2′-dezoxiuridina). Inhibă în special virusurile herpes simplex și vaccinal. Mecanismul de acțiune al antimetabolitului se bazează pe faptul că monofosfați ai BDU sînt convertiți de către kinaze adecvate la di- și trifosfații corespunzători și aceștia, împreună cu trifosfații nucleocapsidici naturali, servesc drept precursori pentru ADN în reacția catalizată de polimeraza ADN (Delamare și Prusoff, 1962).

IDU (5-iodo-2′-dezoxiuridina). Inhibă selectiv sinteza virusurilor SV4O, adeno, herpes simplex, varicelic, herpes zoster, vaccinal și al sarcomului Rous. Mecanismul de acțiune al drogului este asemănător cu al BDU, nu interferează cu enzimele sintetizînd precursorii ADN, ambii fiind astfel convertiți către trifosfat și apoi încorporați în ADN în locul timidinei. ADN rezultat provoacă sinteza proteinelor nefuncționale, ADN se replică, însă maturarea corpusculului viral nu se realizează, ducînd la defecte ale proteinei capsidale.

Dintre compușii uridinei, care depășesc de departe eficiența IDU, menționăm compușii halogenovinili ai dezoxiuridinei și dezoxicitidinei, cei mai activi fiind inhibitorii selectivi ai virusurilor herpes simplex și varicella-zoster.

BVDU [(E)-5-(2-bromovinil)-2′-dezoxiuridina)]. Fiind cel mai potent congener al acestei serii de compuși, inhibă drastic replicarea HSV-1 și VZV în culturi celulare, dar numai de 100—200 de ori mai puțin a tipului 2 de virus herpetic (De Clercq și colab., 1979). Astăzi se cunoaște că BVDU este rapid fosforilat în celulele infectate cu HSV sau VZV, dar nu și în celulele neinfectate. Două enzime specificate de virus ar contribui la selectivitatea drogului ca agent antiherpetic: timidinkinaza, care ar servi ca enzimă activatoare a compusului la celula infectată cu virus, și ADN polimeraza, ce acționează ca enzimă-țintă specifică pentru efectul inhibitor al BVDU.

CVDU [(E)-5-(2-clorovinil)-2′-dezoxiuridina] și *IVDU [(E)-5-(2-iodovinil)-2′-dezoxiuridina].* CVDU și IVDU sînt de asemenea printre cele mai active droguri, inhibînd, la doze extrem de scăzute, replicarea virusurilor herpes simplex tip 1.

Compușii citidinei. *BVDC [(E)-5-(2-bromovinil)-2′-dezoxicitidina* și IVDC [(E)-5-(2-iodovinil)-2′-dezoxicitidina]. S-au dovedit a fi, *in vitro*, prețioși inhibitori selectivi ai herpesvirusului tip 1, însă în doze de 10—15 ori mai concentrate decît compușii uridinei (De Clercq și colab., 1979).

Compușii guaninei. *Acicloguanozina [aciclovir; Zovirax; 9-[(2-hidroxietoxi-metil]-guanina].* Este un analog nucleozidic cu o puternică și selectivă acțiune inhibitoare asupra virusurilor herpes simplex tip 1 și 2, precum și varicella-zoster, cu o toxicitate limitată pentru celulele umane (Schaefer, 1982). Aplicat de Păun și colab. (1985) în cazuri de herpes simplex și de herpes zoster, aciclovirul a prezentat constant un înalt nivel de activitate în aceste infecții. Modul de acțiune al acestui drog este legat de activitatea timidinkinazei, care îl transformă în aciclovirmonofosfat; acesta, la rîndul său, este convertit de către enzimele celulare în aciclovirtrifosfat, care este un puternic inhibitor al ADN polimerazei virale ; ca urmare, se produce blocarea sintezei de ADN viral și, astfel, oprirea multiplicării intracelulare a virusului.

4.3.2.3. *Nucleotidele*

PoliI (sarea de potasiu a acidului poliribozinic) și PoliC (sarea de potasiu a acidului poliribocitidilic). Au proprietăți inhibitoare asupra sarcomului indus de adenovirus la puii de șoarece nou-născuți (Sarma și colab., 1969) sau la puii de hamster nou-născuți (Larson și colab., 1969). Modul de acțiune al acestor produse sintetice dublu-helicoidale este controversat, unii autori atribuindu-le proprietatea de a stimula formarea intensă de interferon, alții considerînd că modifică sinteza ARN și a proteinei celulare.

4.3.2.4. *Nucleozidele azapirimidinei*

6-Azauridina [azaribina ; z^{6}Urd ; 2-β-D-ribofuranozil-as-triazin-3,5-(2H,4H)-diona]. Inhibă cîteva virusuri ARN și ADN, în ordinea sensibilității fiind afectate virusurile : Denga 2, coriomeningitei limfocitare, REO 3, adeno 5, polyoma, al sarcomului Rous, vaccinal, ECHO 7, al encefalitei japoneze, paragripal 3, citomegalic, herpes simplex. *In vivo*, 6-azauridina nu este eficientă ca atare, fiind convertită de către uridinkinază în 6-azauridin-5′-fosfat, care este de fapt inhibitorul real.

5-Azacitidina (5-azacit). Puțin utilizată în chimioterapia antitumorală, dat fiind citotoxicitatea sa înaltă, aceasta prezintă un oarecare interes în replicarea bacteriofagilor.

3-Deazauridina [1-β-D-ribofuranozil-2,4-(1H,3H)-piridindiona]. Inhibă cîteva bacterii și unele tumori experimentale, precum și efectele citopatice induse de rhinovirusurile 1A, Coxsackie A21 și gripal A/PR/8.

4.3.2.5. *Aranucleozidele și aranucleotidele*

Ara-C (arabinozidcitozina ; arabinozilcitozina ; 1-β-D-arabinofuranozilcitozina). Izolată inițial din ciuperca *Cryptothethya crypta*, produsă acum pe cale sintetică, ara-C este metabolizată în araCTP, care acționează ca un inhibitor al ADN polimerazei. Ara-C are o activitate biologică împotriva leucemiei L 1 210 a șoarecelui (Evans și colab., 1961) și în tratamentul keratitei herpetice la iepuri (Underwood, 1962). De asemenea, inhibă multiplicarea virusului vaccinal și a altor virusuri ADN (exceptînd adenovirusul și virusurile ARN) (Radais și Johnson, 1962).

Ara-A (arabinozidadenina, 9-β-D-arabinofuranoziladenina). Are un spectru antiviral larg, fiind sensibile la acest analog virusurile herpes simplex, herpes zoster, citomegalic, Epstein-Barr, pseudorabic, vaccinal, myxomatos, polyoma, adeno, al sarcomului Rous, al leucemiilor murine, rabic și al stomatitei veziculoase. Ara-A acționează ca un lanț terminus al sintezei ADN viral, dar nu și al ADN celular.

Ara-Hx (9-β-D-arabinofuranozilhipoxantina). Ara-Hx este relativ netoxic. Deși numeroși autori au demonstrat inhibarea replicării HSV, a virusurilor herpes zoster și vaccinal, această activitate antivirală a ara-Hx necesită concentrații mult mai mari din acest drog decît ara-A pentru a da aceeași activitate (Conner și colab., 1975).

Ara-T (1-β-D-arabinofuranoziltimina, spongotimina). Izolat din buretele *Cryptothethya crypta*, relativ netoxic pentru majoritatea culturilor celulare, este inhibitor pentru replicarea HSV în culturi celulare (Renis și Buthala, 1965).

Ara-G (9-β-D-arabinofuranozilguanina). Sintetizat de Reist și Goodman (1964), inhibă sinteza ADN la celulele ascitei TA3 și mărește supraviețuirea celulelor TA3 de șoarece nou-născut, dar nu are aceeași eficiență ca ara-A (Brink și Le Page, 1964).

Ara-U (1-β-D-arabinofuranoziluracil ; spongouridina). Ca și ara-T a fost izolat din *Cryptotethya crypta* (Bergman și Feeney, 1951). Ara-U inhibă creșterea celulelor mamifere în cultură, însă concentrația necesară este de peste 100 de ori mai înaltă decît concentrația de ara-C cerută pentru a produce un efect similar, iar pentru a inhiba replicarea HSV este necesară cantitatea de 25—70 de ori mai mare decît pentru ara-T.

FIAC (2′-fluoro-5-iodoaracitozina). Este un inhibitor selectiv al replicării HSV-1 la doze de 2,5—6 ori mai mari decît BVDU, însă nediscriminatoriu, aproape la fel de eficient și asupra HSV-2.

Cu toate investigațiile făcute pînă în prezent, mecanismul de acțiune al aranucleozidelor menționate nu este pe deplin elucidat.

4.3.2.6. *Acizii fosfonici*

AFF (acidul fosfonoformic). Inhibă ADN polimerazele virusului herpes simplex și ale virusului hepatitei virale B, ca și reverstranscriptazele. Este utilizat în tratamentul experimental al herpesului cutanat și genital la cobai (Helgstrand și Öberg, 1978).

AFA (acidul fosfonoacetic). Descoperit în 1973 de Shipkowitz și colab. (citați de Helgstrand și colab., 1978), este un inhibitor al sintezei ADN al virusului herpetic, ce acționează prin inhibiția puternică a polimerazei HSV-1 (Mao și colab., 1975).

4.3.2.7. *Alți compuși chimici*

Ribavirina (1-β-D-ribofuranozil-1,2,4-triazol-3-carboxamida). Este un nucleozid sintetic analog, posedînd proprietăți virustatice cu spectru larg (Sidwell și colab., 1979), virusurile gripale A fiind cele mai sensibile la drog. Modul său de acțiune constă în deteriorarea formării structurii 5′-cap normal la ARNm viral și, consecutiv, interferează cu expresia genomului viral prin alterări ale procesului de translație.

Flumidin [Virugon ; Moroxidin ; N^1,N^1-anhidro-bis-(betahidroxietil)-biguanidin clorhidrat]. Posedă capacitatea de a inhiba multiplicarea virusului herpes simplex tip 1 și 2, precum și a virusului herpes zoster, cu aplicabilitate largă în tratamentul herpesului cu localizări cutaneomucoase (Athanasiu și colab., 1984).

Rodilemid (sarea disodică monocalcică a acidului etilendiaminotetraacetic în asociere cu L-cisteina și gluconatul de calciu). Este un complex de chelatori care, prin legarea ionilor metalici — implicați în toate etapele ciclului de replicare virală — inhibă replicarea virusurilor, modificînd balanța ionică (Perrin și Stünzi, 1981). *In vitro,* Rodilemid nu inhibă replicarea virusurilor herpes de curcă, a adenovirusurilor canine, NDV și virusului bolii Carré. *In vivo,* acest medicament românesc poate curatiza herpesul simplex și herpesul zoster prin inactivarea temporară a unor zinc-enzime implicate în ciclul de replicare virală și chelarea zincului de către agenții chelatori componenți ai medicamentului (Dinu și Dinu, 1985).

4.3.2.8. *Constituenți sau produși microbieni, fungici și virali*

Constituenți bacterieni. *Polizaharidele capsulare ale Klebsiellei pneumoniae.* Purificate, inhibă selectiv replicarea virusurilor urlian (Ginsberg și colab., 1948) și al pneumoniei șoarecelui (Horsfall Jr. și Mc Carty, 1947). Chiar aplicat la 2—3 zile după infecție, polizaharidul inhibă multiplicarea ulterioară a virusului, iar leziunile sînt rezolvate în cele din urmă. Aceasta este prima demonstrație a succesului spectacular al chimioterapiei unei boli virale (Ginsberg și Horsfall Jr., 1951), deși mecanismul intim de acțiune nu este perfect elucidat.

Constituenți ai Corynebacterium. Obținut prin dezagregarea bacteriei supusă tratamentului sonic și colectare pe filtre millipore (Carver și Naficy, 1962), filtratul constituie materialul activ care inhibă replicarea arbovirusurilor A (Sindbis și Chikungunya). Mecanismul de acțiune este încă necunoscut.

Constituente sau produse ale ciupercilor microscopice. Chiar de la Paul Ehrlich, chimioterapia a fost considerată ca un tratament supresiv, realizat pe baza toxicității celulelor. Toți agenții chimioterapici acționează asupra țintelor metabolismului celular, care sînt vitale pentru celula parazitată.

Helenina, M-8450 și Statolonul. Primele două conțin o proteină și probabil ARN, statolonul nu conține o polizaharidă polianionică. Helenina este o substanță elaborată de *Penicillium funiculosum,* activă în tratamentul gripei (Shope, 1953). Helenina, M-8450 și statolonul inhibă replicarea unor picornavirusuri dacă celulele sînt tratate înaintea infecției. Cea mai importantă observație este că statolonul induce sinteza de interferon, fenomen care ar putea explica mecanismul său de acțiune chimioterapică.

Actinomicina D (C_1, dactinomicina). Conținînd peptide policiclice cromofore, a fost izolată din *Streptomyces antibioticus*, în 1940, de Waksman și Woodruff. Actinomicina D inhibă sinteza ARN celular și replicarea virusurilor ADN : vaccinal, variolic, herpetic, al pestei aviare clasice, al sarcomului Rous. Antibioticul, în concentrații netoxice pentru celulă, formează un complex cu ADN, un model de intercalare, prin legăturile de hidrogen cu radicalul dezoxiguanozin, oprind sinteza ARN viral (Müller și Crothers, 1968).

Olivomicina, Cromomicina A_3, Mithramicina. Foarte asemănătoare ca structură, inhibă selectiv sinteza ARN a celulelor animale și bacteriene și inhibă efectiv reacțiile ADN polimerazei și ARN polimerazei dependente de ADN. Ca și actinomicina D, aceste antibiotice necesită pentru legare resturile de guanină din ADN dublu-spiralat.

Streptonigrina, Rufocromomicina, Bruneomicina. Sînt antibiotice identice, produse de *Streptomyces flocculus, Streptomyces rufochromogenes* și respectiv *Streptomyces albus* și *echinatus*. Inhibă bacteriile grampozitive și gramnegative, reprezintă un inductor al producției de fagi în bacteriile lizogene și sînt eficiente în tratamentul limfogranulomatozei.

Rifamicina. Derivat sintetic din *Streptomyces mediteraniensis*, este semnalată ca fiind un preventiv al maturării adenovirusului infectat (Subak și colab., 1969) și al virusului vaccinal (Heller și colab., 1969).

Produse virale. *Interferonii.* Fenomenul de interferență a fost mediocru înțeles pînă ce Isaacs și Lindemann, în 1957, au descoperit interferonii, glicoproteine produse în celulele infectate de virus și capabile de interferare cu replicarea diferitelor virusuri. Mai tîrziu, s-a dovedit că aceste substanțe neantigenice pot fi produse nu numai în celulele infectate cu aproape orice virus animal, conținînd ADN sau ARN, în culturi de țesuturi sau în animal, dar chiar și de către multe substanțe imunopotențatoare, capabile să inducă sau să elimine interferon (Werner și Zerial, 1984). Mari producătoare de interferon rămîn cinci grupe de virusuri (picorna —, arbo —, myxo —, papova — și poxvirusurile) la care se adaugă virusurile stomatitei veziculoase și al sarcomului Rous. Sensibile la interferon sînt toate virusurile producătoare de interferon exceptînd virusurile Papova și herpetice. Recent, s-a arătat că cele două tipuri cunoscute de interferon (I și II) pot acționa sinergic cu privire la inhibiția replicării virusului encefalomiocarditei șoarecelui (Fleischman Jr. și colab., 1979) și la inducerea intracelulară a enzimelor antivirale, cum este 2-5A sintetaza și 67K proteinkinaza (Zerial și colab., 1982) ; aceasta sugerează că protecția simultană a ambelor tipuri de interferon prin agenții imunostimulatori reprezintă un mecanism avantajos al apărării antivirale (Evans și Johnson, 1981).

La 30 de ani de la descoperirea interferonilor, mecanismul lor de acțiune nu este pe deplin elucidat, nu este încă stabilit dacă efectele lor clinice sînt modulate prin mecanisme antivirale sau imunologice. S-au identificat cel puțin două enzime [2-5A sintetaza și proteinaza (s)] care sînt induse ca răspuns la interferon şi pot fi rezonabil incriminate a juca un rol vital în acţiunea sa.

Astăzi se consideră că intervenţia interferonului se produce pe cel puţin trei căi diferite : prima ar fi cea mediată de o proteinkinază indusă de interferon, care inactivează factorul ribozomal de iniţiere (Samuel, 1979) ; a doua cale, la nivelul traducerii, ar consta în formarea de acid 2', 5'-oligoadenilic ce activează o endonuclează celulară latentă care degradează ARNm viral şi prin aceasta sinteza virusului (Kerr şi Brown, 1978) ; a treia cale pare să se manifeste prin inhibarea elongaţiei catenei polipeptidice, ce determină degradarea nucleotidelor terminale ale ARNt (Schmidt şi colab., 1979). În sfîrşit, după alţi autori, interferonii ar acţiona ca agent antiviral la nivelul transcrierii ARN viral (Friedman, 1978) sau prin stimularea activităţii naturale a celulelor de a apăra organismul *(natural killer activity)*, producînd şi creşterea limfocitelor T (Hirsch şi Swartz, 1980).

Factorul inhibitor viral (VIP). Rezultat în urma cultivării poliovirusului de tip 2, permite trecerea în stare de latenţă a unor virusuri. Spre deosebire de interferon, cu care se aseamănă în ceea ce priveşte proprietăţile fizice şi dinamice, acesta este activ numai atîta timp cît se află în cultură, pe cînd interferonul determină în celulă modificări persistente, care menţin rezistenţa celulei şi după îndepărtarea acestuia.

4.4. ASPECTE CRITICE

Agenţii biologici s-au dovedit a nu prezenta nici un interes practic, atît în ceea ce priveşte capacitatea lor distructivă, cît şi conservantă asupra virusurilor, astfel încît au fost prezentaţi în capitolul de faţă mai mult sub aspect al cunoaşterii.

Pe de altă parte, doar un număr restrîns din evantaiul larg al agenţilor chimici (care cunosc, de altfel, o aplicabilitate de peste un secol) par a deţine şi astăzi supremaţia în arsenalul virusologic. Dintre aceştia enumerăm doar *glicerina* (care distruge selectiv bacteriile şi ciupercile, respectînd virulenţa corpusculului viral) pentru păstrarea îndelungată a preparatelor virale, *formolul* şi *fenolul,* utilizaţi pentru atenuarea sau inactivarea virusurilor-vaccin. Ne putem întreba pe bună dreptate dacă această epocă primară de acţiune simplistă asupra corpusculului viral nu este cumva depăşită, fapt pentru care, în finalul acestui capitol, propunem conceptul de *„generaţii“ de agenţi ce acţionează asupra virusurilor*. Este demn de remarcat că suprafaţa de atac a agenţilor antivirali este foarte mare. La un virus bine studiat din acest punct de vedere — virusul vegetal al mozaicului tutunului — dacă numărul nucleotidelor din genomul său infectant se ridică la „numai“ 6 400, proteina de înveliş a particulei virale conţine aproximativ 340 000 de aminoacizi (Stryrer, 1981), care formează un număr maxim de legături şi o structură finală simetrică, ce-i conferă o mare stabilitate. Este poate explicaţia pentru rezistenţa deosebită a capsidei proteice virale care, deşi străpunsă de aceşti agenţi (care continuă să pătrundă mai departe, inactivînd acidul nucleic), o lasă capabilă de a rămîne în continuare antigenică.

Dar această structură complexă și stabilă face ca o populație definită de virioni expusă la un agent inactivant, pentru un timp limitat, să conducă la inactivarea unei proporții bine stabilite de corpusculi virali, ceilalți păstrîndu-și însă infectivitatea. Discutînd din punct de vedere statistic această afirmație, putem arăta că, extinzînd inactivarea chiar la dozele cele mai înalte, nu se poate susține ferm că proba este total inactivată, un supraviețuitor putînd oricînd exista în continuare la un număr oarecare de virioni. Deși inactivarea totală nu poate fi obținută, practic se poate atinge o inactivare „de siguranță“ *(„safe inactivation“)*, care să confere un risc acceptabil pentru utilizarea eșantionului la prepararea unui vaccin antiviral (Davies și colab., 1968).

Un alt aspect, prezentat de data aceasta de inhibitorii selectivi ai biosintezei virale, este toxicitatea substanței. Virusul fiind un produs al activității celulare, orice drog folosit pentru blocarea acesteia are repercusiuni — la o anumită doză — și asupra celulei-gazdă, fapt ce-i limitează aplicabilitatea. Pe de altă parte, o serie de substanțe, care *in vitro* au un efect cert inhibitor al biosintezei virale, nu și-au găsit o aplicabilitate largă în terapia antivirală ; este cazul unor antibiotice (actinomicina D, violamicina BI) și al multor altor substanțe care nu sînt utilizate în prezent decît experimental, *in vitro*.

O altă problemă este utilizarea în prezent a unor unități de măsură diferite, dar aproximativ echivalente, care pot deruta pe nespecialist, prezentînd prin urmare riscuri de erori, astfel :

a) pentru lungimi (lungimi de undă, spre exemplu) sînt exprimate unele date de la autor la autor, unele în nm, altele în µm sau în Å ori în X ; cu acest prilej notăm că :

$$1\ \text{mm} = \quad = 10^{-3}\ \text{m}$$
$$1\ \mu\text{m} = \quad = 10^{-6}\ \text{m}$$
$$1\ \text{nm} = \quad = 10^{-9}\ \text{m}$$
$$1\ \text{Å} = \quad = 10^{-10}\ \text{m}$$
$$1\ \text{pm} = 1\text{X} = 10^{-12}\ \text{m}$$

În conformitate cu Hotărîrile Comisiei Internaționale de Unități, exprimate la cea de-a XVI-a Conferință Generală de Măsuri și Greutăți (Paris, 1981), se dau următoarele prefixe pentru unitățile Sistemului Internațional (SI) (tabelul 4-VI).

TABELUL 4-VI

Prefixele pentru unitățile SI

Factor	Prefix	Simbol	Factor	Prefix	Simbol
10^{18}	exa	E	10^{-3}	mili	m
10^{15}	peta	P	10^{-6}	micro	µ
10^{12}	tera	T	10^{-9}	nano	n
10^{9}	giga	G	10^{-12}	pico	p
10^{6}	mega	M	10^{-15}	femto	f
10^{3}	kilo	k	10^{-18}	atto	a

b) Activitatea unei surse radioactive (A), dată de numărul de nuclee care se dezintegrează în unitatea de timp, era exprimată pînă relativ recent în curie (Ci)*, în prezent întîlnindu-se însă tot mai recent exprimată în unități SI prin mărimea becquerel (Bq) se reprezintă 1 dezintegrare/s. Între acestea există următoarele relații, exprimate prin conversia unităților de măsură cu conținut de radioactivitate (tabelul 4-VII).

TABELUL 4-VII

Conversia din curie în becquereli

µCi mCi Ci	kBq MBq GBq	µCi mCi Ci	MBq GBq TBq
0,1	3,7	30	1,11
0,2	7,4	40	1,48
0,25	9,25	50	1,85
0,3	11,1	60	2,22
0,4	14,8	70	2,59
0,5	18,5	80	2,96
1	37	90	3,33
2	74	100	3,7
2,5	92,5	125	4,625
3	111	150	5,55
4	148	200	7,4
5	185	250	9,25
6	222	300	11,1
7	259	400	14,8
8	296	500	18,5
9	333	600	22,2
10	370	700	25,9
12	444	750	27,75
15	555	800	29,6
20	740	900	33,3
25	925	1 000	37

Conversia din becquereli în curie

1 Bq = $2,703 \times 10^{-11}$ Ci
1 kBq = $2,703 \times 10^{-8}$ Ci
1 MBq = $2,703 \times 10^{-5}$ Ci
1 GBq = $2,703 \times 10^{-2}$ Ci
1 TBq = $2,703 \times 10$ Ci

c) Expunerea, notată cu x, sarcină electrică de o radiație în unitatea de aer uscat, se exprimă în coulomb/kg. Mărimea tolerată, încă, este röntgen-ul (R) egal cu $3,58 \times 10^4$ coulomb/kg. Această mărime, ca de altfel și rad-ul și rem-ul, se folosește nu numai în domeniul radiațiilor nucleare, ci și în acela al radiațiilor X și γ, dar numai pînă la energii de 3 MeV în cazul rad-ului.

---

[*] 1 Ci este echivalent cu $3,7 \times 10^{10}$ dezintegrări/s (specifică la 1 g de radiu).

d) Pentru *doza absorbită* (energia unei radiații absorbite de unitatea de masă a materialului iradiat), notată cu *D*, încă se mai folosește vechea unitate rad*, dar în prezent începe să capete circulație o altă unitate de doză „legală“, însă mai puțin utilizată, gray-ul (notată Gy) care exprimă „doza de energie absorbită“ necesară pentru cuantificarea efectului biologic al radiației, cuprinzînd informații asupra cantității de energie absorbită de radiație *per* unitatea de masă și perioada de timp. Aceste unități diferite pot fi transformate utilizînd următoarele relații :

$$1\ \text{Gy} = 1\ \text{J/kg}$$
$$1\ \text{rad} = 100\ \text{erg/g} = 10^{-2}\ \text{Gy}$$
$$1\ \text{R} = 2{,}58\times10^{-4}\ \text{C.kg}^{-2}$$

Transformarea unităților de măsură pentru energie poate fi urmărită în tabelul 4-VIII.

TABELUL 4-VIII

Transformarea unităților de măsură pentru energie

	kgf·m	erg	J(Ws)	eV	cal	kWh
1 kgf·m	1	$9{,}81\cdot10^{7}$	9,81	$6{,}12\cdot10^{19}$	2,34	$2{,}72\cdot10^{-6}$
1 erg	$1{,}02\cdot10^{-8}$	1	10^{-7}	$6{,}24\cdot10^{11}$	$2{,}39\cdot10^{-8}$	$2{,}78\cdot10^{-14}$
1 J (Ws)	0,102	10^{7}	1	$6{,}24\cdot10^{18}$	0,239	$2{,}78\cdot10^{-7}$
1 eV	$1{,}63\cdot10^{-20}$	$1{,}6\cdot10^{-12}$	$1{,}6\cdot10^{-19}$	1	$3{,}83\cdot10^{-20}$	$4{,}45\cdot10^{-26}$
1 cal	0,427	$4{,}19\cdot10^{7}$	4,19	$2{,}61\cdot10^{19}$	1	$1{,}16\cdot10^{-6}$
1 kg huilă	$3{,}4\cdot10^{6}$	$3{,}34\cdot10^{14}$	$3{,}34\cdot10^{7}$	$2{,}1\cdot10^{26}$	$8\cdot10^{6}$	9,28

e) Doza echivalentă, notată cu sigla *B*, efect biologic al unui anumit tip de radiații, este definită ca fiind produsul dintre doza absorbită și eficacitatea biologică a radiației. Se precizează că *B* = *D* și se exprimă prin mărimea sievert (Sv), care este egală cu 1 Gy. O unitate încă tolerată este rem-ul, iar 1 Sv = 100 rem (tabelul 4-IX).

TABELUL 4-IX

Relațiile dintre unitățile SI și non-SI

Cantitate fizică	Unitate SI	Unitate non-SI	Relația
activitatea	*becquerel* (Bq) 1 Bq = 1/s	*curie* (Ci)	$1\ \text{Bq} = 2{,}703\times10^{-11}\ \text{Ci} = 27{,}03\ \text{pCi}$ $1\ \text{Ci} = 3{,}7\times10^{10}\ \text{Bq} = 37\ \text{GBq}$
doza absorbită	*gray* (Gy) 1 Gy = 1 J/kg	*rad* (rad)	1 Gy = 100 rad 1 rad = 0,01 Gy = 10 mGy
echivalent-doză	*sievert* (Sv) 1 Sv = 1 J/kg	*rem*	1 Sv = 100 rem 1 rem = 0,01 Sv = 10 mSv
expunere	*coulomb/kg* (C/kg)	*röntgen* (R)	1 C/kg = 3 876 R = 3,876 kR $1\ \text{R} = 2{,}58\times10^{-4}\ \text{C/kg}$ = 258 μC/kg

---

* $1\ \text{rad} = 10^{-2}\ \text{J/kg}$.

În concluzie, avînd în vedere argumentele expuse în prezentul capitol, opinăm pentru o uniformizare neîntîrziată a terminologiei referitoare la unitățile de măsură în domeniul medicinii radiațiilor, pentru exprimarea parametrilor de lucru conform cu standardele internaționale, ceea ce va aduce un plus de claritate și precizie în aprecierea rezultatelor comunicate (vezi tabelul 4-IX).

4.5. PERSPECTIVE

Dacă unii agenți fizici, chimici sau biologici — între care ultrapresiunea și chiar ultrasunetele, majoritatea agenților chimici și toți agenții biologici — și-au demonstrat în timp limitele, nefiind larg sau eficient utilizați, considerăm că, fără a abandona sau subaprecia metodele convenționale de modelare a virusurilor, utilizînd tehnica de vîrf și rafinamentul cercetării contemporane, există premisele unei abordări superioare, complexe, a acestei probleme de maximă importanță pentru virusologia modernă.

În acest sens propunem *conceptul de clasificare în trei „generații“ a metodelor și mijloacelor de acțiune asupra virusurilor*, după cum urmează :

Generația I : Agenții fizici, chimici și biologici clasici.
Generația a II-a : Inhibitorii selectivi ai biosintezei virale.
Generația a III-a : Chimioterapicele virale programate topic și ingineria genetică pe baza tehnologiei ADN-recombinant.

Metodele și mijloacele de generația I. Metodele convenționale care folosesc agenții fizici, chimici și biologici au fost prezentate în capitolul de față. Nu vom menționa aici decît perspectiva îmbogățirii arsenalului de substanțe protectoare criogene care să maximizeze calitatea virusurilor liofilizate, folosirea mai largă a radiațiilor ionizante (despre care sîntem convinși că nu și-au spus ultimul cuvînt), precum și expunerea preparatelor virale la acțiunea radiațiilor cosmice și a ionilor grei. Această ultimă metodă nu a fost încă utilizată datorită dificultăților tehnice actuale legate de scoaterea în afara navelor spațiale, în condiții extraatmosferice, a preparatelor virale, procedeu care ar putea duce la noi tehnologii, într-un domeniu în care nu s-a încercat încă aproape nimic.

Un exemplu în acest sens este că, foarte recent, în octombrie 1988, în cadrul cercetărilor efectuate în condiții de microgravitație de la bordul navetei spațiale „Discovery“, s-a luat în studiu reverstranscriptaza, enzimă ce intervine decisiv în procesele de replicare intracelulară a virusurilor HIV, incriminate a declanșa SIDA. „Cunoașterea structurii tridimensionale a enzimei pe care dorim s-o fabricăm — a declarat Dr. Charles Pruggne — poate conduce spre aflarea exactă a zonei active a acesteia și la elaborarea unui compus adecvat de anihilare funcțională a ei ; astfel azidotimidina, cel mai răspîndit compus folosit împotriva reverstranscriptazei, nu reacționează cu destulă eficacitate în prezent și are efecte secundare tocmai datorită unor deficiențe structurale". Aceste creșteri de cristale proteice se află acum în stadiu de cercetare de laborator, experiențele putînd însă dura cîțiva ani.

Metodele și mijloacele de generația a II-a. Superioare celor de primă generație, sînt limitate totuși datorită citotoxicității drogurilor și, în majoritatea lor, inaplicabilității lor largi *in vivo*.

Plecînd de la observația că virusurile depind prin replicarea lor de procesele biosintetice ale celulei-gazdă, care limitează sever posibilitățile noastre pentru o inhibiție selectivă a replicării virale și care au permis pînă în prezent doar succese modeste, apreciem că screening-ul masiv al diferitelor substanțe va revela noi chimioterapice cu un potențial atac distinct de metabolismul celulei-gazdă. Trebuie să precizăm aici însă că numai pentru elaborarea clortetraciclinei au fost izolate 36 000 de tulpini, din care „numai" 16 000 au trecut prima serie de teste, ce au indicat că doar 3 400 pot prezenta un cert interes și, dintre acestea, numai o singură tulpină — *Streptomices aureofaciens* — și-a găsit o aplicabilitate practică majoră.

Subliniem că cea mai caracteristică proprietate virală, adsorbția la receptorii celulei, nu a fost exploatată îndeajuns pentru scopuri chimioterapice, deși ar părea *a priori* cel mai logic atac. De asemenea, dintre inhibitorii selectivi ai biosintezei virale, interferonii ar putea constitui, în mod expres, agenți antivirali ideali, pentru că acționează asupra multor virusuri diferite, fără a avea efect toxic celular, deși pînă în prezent s-au dovedit a nu avea nici un efect (sau un efect limitat) asupra sintezei virale după ce ea a fost inițiată în celula-gazdă.

Metodele și mijloacele de generația a III-a. Ne vom referi la vehiculele pentru chimioterapia topică virală și la ingineria genetică.

Limitativ, referitor la bolile neoplazice, a căror etiologie este din ce în ce mai mult acceptată ca fiind de natură virală, s-au făcut numeroase încercări de tratament. Dintre acestea, cea care utilizează anticorpii ca purtători de radioactivitate spre a o transporta în țesutul canceros diseminat larg în organism, în scopul de a iradia și distruge celulele canceroase, oferă, teoretic, premise pline de optimism pentru obținerea în viitor a unor preparate de anticorpi marcați radioactiv, de mare selectivitate, cu aplicații în diferite viroze tumorale.

Pe de altă parte, lipozomii, transportori de droguri chimioterapice cu aplicabilitate generalizată, apăruți cu cîțiva ani în urmă în arsenalul tehnologic de specialitate, ar putea capta un interes major în virusologie. Lipozomii sînt membrane artificiale sferice (cu diametre de ordinul Å), care închid un spațiu intern, în care se încorporează produsul de transportat : un acid nucleic, o toxină, o proteină, un drog, interferoni etc. Fuziunea lipozomilor (în interiorul cărora s-au încorporat în prealabil macromoleculele dorite) cu membrana plasmatică celulară sau absorbția lor prin endocitoză au drept rezultat transferul intracelular al produsului încapsulat.

Lipozomii pătrund în celule prin alte mecanisme decît moleculele libere, învingînd barierele de suprafață impuse de membrana celulară, motiv pentru care ei pot fi folosiți pentru introducerea unor macromolecule care, în mod normal, nu pot pătrunde în celulă.

Astfel, celulele care sînt în afara razei de acțiune a unui virus au putut fi infectate de către virusul respectiv (sau mai bine de către acidul său nucleic) încorporat în lipozomi (Wilson și colab., 1977). Celule rezistente la anumite toxine au putut fi distruse de către acestea prin același procedeu (Nicolson și Poste, 1978), iar celule tumorale pot fi inhibate în multiplicarea lor de către lipozomi ce transportă antibiotice cu masă moleculară mică (adriamicina, violamicina BI), antibiotice care, dacă ar fi fost folosite pe căi normale ar fi produs un puternic efect toxic asupra miocardului (Galizon și Trainin, 1980 ; Rahman și colab., 1982) ; de asemenea, cromozomi incluși în lipozomi au putut fi transferați în alte celule (Mukherjee și colab., 1978), iar droguri încorporate în lipozomi au fost transportate cu ajutorul acestora la celulele-țintă (Gregoriadis și Buckland, 1973).

Recent, în Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau“ s-au întreprins cercetări în domeniul profilaxiei virale în care s-au utilizat lipozomi drept *„carrier“* al antigenului gripal spre celulele-țintă. Determinările radiometrice au dovedit o bună purificare a preparatelor, eficiența de încapsulare în lipozomi a materialelor biologic active și distribuția în organe a radioactivității legate de lipozomi, iar rezistența indusă de aceștia față de infecția gripală a fost solidă și de lungă durată (Burducea și colab., 1989).

La baza utilizării lipozomilor drept *„carrier“* pentru diferite droguri și alte tipuri de macromolecule stă proprietatea lor de a proteja macromoleculele încapsulate în mediul acelular, precum și o amplificare a captării acestora de către celulă, prin mecanisme ce nu acționează în mod obișnuit decît la facilitarea captării substanțelor incluse în *„carrier“* de către celulă, putînd chiar mări eficacitatea lor farmacodinamică (Poste și Papahadjopoulos, 1976).

În sfîrșit, ingineria genetică, definită ca ansamblu de metode și tehnologii efectuate *in vitro* cu gene, cromozomi și uneori cu celule întregi, în scopul „construirii“ unei structuri genetice cu proprietăți ereditare premeditate (Popa și Repanovici, 1982), inaugurează de fapt era intervenției active a omului asupra patrimoniului transmisibil genetic al organismului (fig. 4-15).

Bazată pe tehnologia ADN recombinant, ingineria genetică se realizează prin scindarea fină și reproductibilă a materialului genetic cu ajutorul enzimelor de restricție, legarea fragmentelor de ADN cu ADN ligaze și introducerea moleculelor de ADN străine, pentru construirea de molecule de ADN hibride cu caracterele dorite, capabile de a se autoreplica.

Dintre cele mai remarcabile realizări ale ingineriei genetice în domeniul virusologiei menționăm : obținerea ADN recombinant conținînd gena pentru antigenul viral al hepatitei virale B (Burrell și colab., 1979), producerea interferonului prin tehnologia ADN recombinant (Nagata și colab., 1980), obținerea ADN recombinant conținînd gena hemaglutininei virusului gripal (Emtage și colab., 1980), realizarea recentă (1986), prin inginerie genetică, de către Institutul Național al Sănătății din Japonia, a unei noi versiuni de vaccin gripal, de 20 de ori mai eficient decît precedentele, utilizînd antigenele de suprafață ale tulpinii circulante de virus.

Există, prin urmare, toate premisele ca aplicarea acestei tehnologii să optimizeze maximal producția de vaccinuri, seruri imune pentru diag-

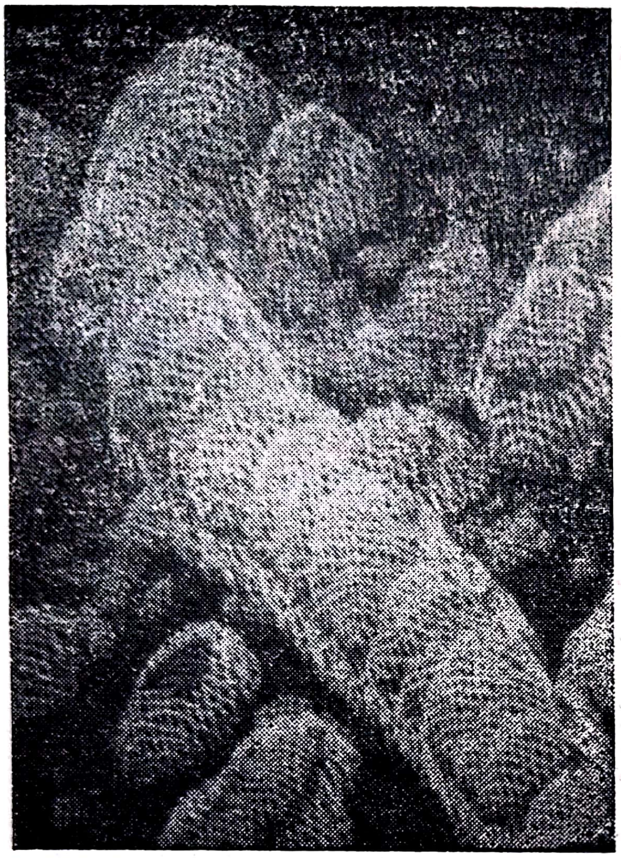


Fig. 4-15 — O fotografie istorică — prima fotografie la nivel atomic a unei molecule: un fragment al moleculei dublului lanț ADN cu grosimea de 90 Å, mărit de 7 300 000 de ori cu ajutorul microscopului scanner cu „efect tunel“ al electronilor, obținut cu ajutorul unei descărcări electrice printr-un ac de tungsten care baleiază la 10 Å distanță de molecula de ADN; mișcarea acului este apoi tradusă de către un computer într-o hartă topografică a suprafeței investigate (după Gerd Binning și Saint Gallois Heinrich Rohrer care, pentru această fotografie în care se văd atomii individuali, au primit Premiul Nobel pentru fizică în 1986).

nosticul virusologic și interferon, prin utilizarea antigenelor manipulate genetic. Subtilitățile tehnice și eficiența ideală plasează — după opinia noastră — această metodă în categoria de ultimă generație în ceea ce privește arsenalul mijloacelor de acțiune asupra virusurilor.

Bibliografie selectivă

BARRYWOOD W. jr. — Principles of Microbiology and Immunology, Harper și Row E. (red.), p. 1 211, ed. a IV-a, 1981.

BERCEANU S., PĂUNESCU E. — Biologia și patologia imunității, p. 101, Edit. Academiei R. S. România, București, 1981.

BUKRINSKAYA A. G., BURDUCEA O., GITELMAN A. K. și colab. — Exp. Cell Res., 1966, 42, 484.

BUKRINSKAYA A. G., GITELMAN A. K., BURDUCEA O. și colab. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1966, 123, 236.

BURDUCEA O. — Rev. Roum. Méd., Virol., 1979, 30, 267.

CAJAL N. — În Metodele Laboratorului Clinic, Alteraș I., Cajal N., Cojocaru I., Comoroșan S., Dăncescu P., Ieremie T., Kondi N. (red.), p. 921, Edit. Medicală, București, 1964.

CAJAL N., BURDUCEA O. — Arch. Union Méd. Balkan., 1963, 1, 675.

CAJAL N., BURDUCEA O., KONSTANTINOVA I. — Raport la a XV-a Consfătuire de medicină și biologie cosmică din cadrul Programului Interkosmos, București, 9.V.1982.

DINU R., DINU I. — Rodilemid, Centrala Ind. Med. Cosm. Color. Lab., București, 1985, p. 7.

EVANS A. S., NIEDERMAN C. — În Viral Infections of Humans, Evans A. S. (red.), p. 253, ed. a II-a, Plenum Medical Book Comp., New York — Londra, 1983.

MISHELL B. B., SHÜGI M. S. — Selected Methods in Cellular Immunology, Freemen W. H. Comp., San Francisco, 1980.

NICOLAU ŞT. S. — Elemente de Inframicrobiologie Generală, Edit. Academiei R. P. România, Bucureşti, 1956.

NICOLAU ŞT. S. — Elemente de Inframicrobiologie Specială, Edit. Medicală, Bucureşti, 1962.

PĂUN L., CEAUŞU E., ERŞCOIU S. şi colab. — Rev. Roum. Méd., Virol., 1986, 1, 23.

POPA L. M., REPANOVICI R. — Tehnologia ADN recombinant, p. 246, Edit. Ştiinţifică şi Enciclopedică, Bucureşti, 1982.

POSTE J. — Biol. Cell, 1983, 47, 19.

RAHMAN A., MORE N., SCHEIN P. — Cancer Res., 1982, 42, 1 817.

VASILESCU V., NAGY I. O. — Ultrasunetele în medicină şi biologie, Edit. Medicală, Bucureşti, 1984.

VOICULESCU C., MIHANCEA N. — Virusuri şi reactivitate, Edit. Scrisul Românesc, Craiova, 1982.

WERNER G. H., ZORIAL H. — În Viral Chemotherapy, Shugar D. (red.), vol. I, p. 533, Pergamon Press, Oxford — New York, 1984.

ZARNEA G. — Tratat de Microbiologie generală, vol. I (Virologie generală), Edit. Academiei R. S. România, Bucureşti, 1983.

ZUCKERMAN A. J. — Viral Hepatitis, Arias M. I. şi Frenkel M. (red.), North-Holland American Elsevier, New York, 1981.

* * * — Farmacopeea română, ed. a VIII-a, Edit. Medicală, Bucureşti, 1963.

* * * — Sistemul internaţional de unităţi, Edit. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1982.

5

Principalele metode biochimice pentru identificarea și caracterizarea virusurilor

5.1. INTRODUCERE

În perioada de început a virusologiei medicale, situată în prima parte a secolului nostru, caracterizarea virusurilor se efectua în principal pe criterii biologice și serologice. Progresele rapide ale biologiei moleculare, care au avut loc după 1950, au influențat însă în mod radical și virusologia, plasînd-o practic într-o nouă fază a dezvoltării sale. Mai ales în ultimele două decade au apărut și s-au perfecționat metode moderne de caracterizare, care s-au dovedit a fi deosebit de utile atît pentru diagnosticul și controlul bolilor virale, cît și pentru studiile epidemiologice.

În etapa actuală, identificarea și caracterizarea virusurilor, indiferent de natura lor, poate fi realizată prin diferite tehnici clasice și moderne de serologie, microscopie electronică, culturi celulare, metode biochimice și biofizice etc. Pentru ca diagnosticul să fie cît mai precis, se recomandă ca metodele amintite să fie astfel asociate încît „imaginea“ virusului să apară cît mai completă. Numai procedînd în acest mod se poate ajunge la un diagnostic exact al bolilor virale, precum și la alegerea celor mai indicate tulpini virale pentru obținerea vaccinurilor.

Dintre toate metodele de caracterizare a virusurilor, cele biochimice par să ocupe un rol cu totul deosebit, întrucît permit stabilirea cu mare finețe atît a structurii genomurilor virale, cît și a produselor pe care le sintetizează, și anume a proteinelor virale. Cu ajutorul metodelor biochimice s-au putut preciza nu numai structura exactă a unor virusuri, ci și mecanismul prin care apar tulpini virale noi, implicate în producerea unor epidemii sau a unor pandemii.

Principalele metode moleculare de identificare și caracterizare a virusurilor, aplicabile studiilor de epidemiologie, diagnostic și control al infecțiilor virale, recomandate de Organizația Mondială a Sănătății (OMS) în 1983, sînt cele menționate în tabelul 5-I.

Prin urmare, metodele moderne de caracterizare a virusurilor se împart în trei categorii principale. Prima se referă la caracterizarea genomurilor virusurilor ARN, a doua la genomurile virusurilor ADN, iar ultima la caracterizarea proteinelor codificate atît de genomurile virusurilor ARN, cît și de genomurile virusurilor ADN.

TABELUL 5-I

Tehnici moleculare de caracterizare a virusurilor și aplicațiile lor (modificat după Raportul OMS, 1983)

Componența virală analizată	Metoda	Principalele aplicații	Substanțe speciale necesare	Grad de complexitate*	Domeniu de utilizare
1	2	3	4	5	6
Genomul virusurilor ARN	Analiza electroforetică în gel de poliacrilamidă	Virusuri cu genom fragmentat (cazul virusurilor gripale și rotavirusurilor)	— izotopi radioactivi; — colorație argentică	++	*DEC***
	Harta oligonucleotidelor —T_1 (metoda amprentelor)	Virusuri gripale, poliovirus, flavivirusuri, rotavirusuri	— izotopi radioactivi; — RNază T_1	+++	*DEC*
	Hibridizare moleculară ARN—ARN	Virusuri gripale, rotavirusuri	— izotopi radioactivi: — enzime speciale	+++	*EC*
	Determinarea secvențelor de nucleotide	Toate virusurile	— izotopi radioactivi; — enzime speciale	++++	*C*
Genomul virusurilor ADN	Analiza electroforetică în gel de poliacrilamidă	Virusuri cu genom mic (SV40, HBV)	— izotopi radioactivi; — colorație argentică	++	*DEC*
	Analiza de restricție	Virusuri adeno, herpetic, citomegalic, pox, papilloma, varicelic	— enzime de restricție; — izotopi radioactivi; — colorație argentică	++	*DEC*
	Hibridizarea moleculară ADN—ADN	Herpetic, HBV	— izotopi radioactivi; — sonde moleculare; — enzime	+++	*DEC*
	Analiza secvențelor de nucleotide	Toate virusurile	— izotopi radioactivi; — enzime; — reactivi speciali	++++	*C*
Proteinele virale	Analiza electroforetică în gel de poliacrilamidă cu DDS	Virusuri gripale și polio	— izotopi radioactivi; — colorație argentică	+	*EC*

1	2	3	4	5	6
	Analiza antigenică	Toate virusurile	— anticorpi specifici	+	*DEC*
	Focusare izoelectrică	Poliovirus	— izotopi radioactivi	++	*EC*
	Harta peptidelor	Virusuri gripale	— izotopi radioactivi; — enzime speciale	+++	*EC*
	Analiza secvențelor de aminoacizi	Toate virusurile		++++	*C*

* Gradul de complexitate tehnică de la simplu (+) la foarte complex (++++).

** *D* = diagnostic ; *E* = studii epidemiologice ; *C* = util în lucrări de cercetare.

5.2. METODE DE CARACTERIZARE A GENOMURILOR ARN

5.2.1. ANALIZA ELECTROFORETICĂ ÎN GEL DE POLIACRILAMIDĂ

Pe baza antigenicității proteinelor interne — nucleoproteina și proteina-*matrix* — virusurile gripale au fost clasificate în trei tipuri : A, B și C (Pereira, 1969). Virusurile de tip A au fost izolate de la animale, păsări și om, iar cele de tip B și C pînă în prezent s-au găsit doar la om (Ward, 1981).

Potrivit unor date recente, genomurile virusurilor din grupele A și B sînt segmentate, conținînd cîte opt fragmente, care diferă între ele atît în ceea ce privește masele lor moleculare, cît și în ceea ce privește informația genetică pe care o conțin (Racaniello și Palese, 1979 ; Ghendon, 1982).

Pentru virionii de tip C inițial s-a precizat că ei conțin doar cîte patru fragmente de ARN în genom (Palese și colab., 1978), dar ulterior s-a constatat că de fapt acești virioni conțin un genom constituit din șapte fragmente de ARN (Ghendon, 1982). Masa moleculară totală a genomului virusului gripal A (A_0/PR/8/34) a fost estimată la $4{,}9 \times 10^6$ daltoni, pe baza analizei fragmentelor de ARN denaturate cu glioxal (Desselberg și Palese, 1978). Pentru genomul virusului de tip B, masa moleculară s-a dovedit a fi ceva mai mare, adică de $5{,}3 \times 10^6$ daltoni, datorită faptului că fiecare fragment de ARN al virusurilor B este mai mare decît fragmentele corespunzătoare ale virusurilor A (Desselberg și Palese, 1978).

Estimarea lungimii fragmentelor de ARN s-a făcut foarte exact prin clonarea lor. Fragmentele de ARN au fost copiate în molecule ADNc corespunzătoare, amplificate în cantități suficiente, iar apoi au fost analizate secvențele lor. S-a constatat că cel mai mare fragment (fragmentul 1) conține 2 390 de baze, iar fragmentul cel mai mic (fragmentul 8) conține doar 890 de baze (Sleigh, 1979).

Analiza genomurilor ARN segmentate se poate face relativ ușor, cu ajutorul electroforezei în gel de poliacrilamidă. În fig. 5-1 se prezintă, pentru exemplificare, caracterizarea prin această metodă a genomurilor celor trei tipuri de virusuri gripale (A, B și C). Analiza s-a dovedit a fi extrem de utilă și în studiile epidemiologice. De exemplu, pe baza ei s-a dedus că virusul gripal porcin New Jersey, izolat de la recruții din Fort Dix, nu reprezintă un recombinat derivat dintr-o tulpină umană, ci un virus porcin și, ca atare, virusul izolat nu este un candidat pentru

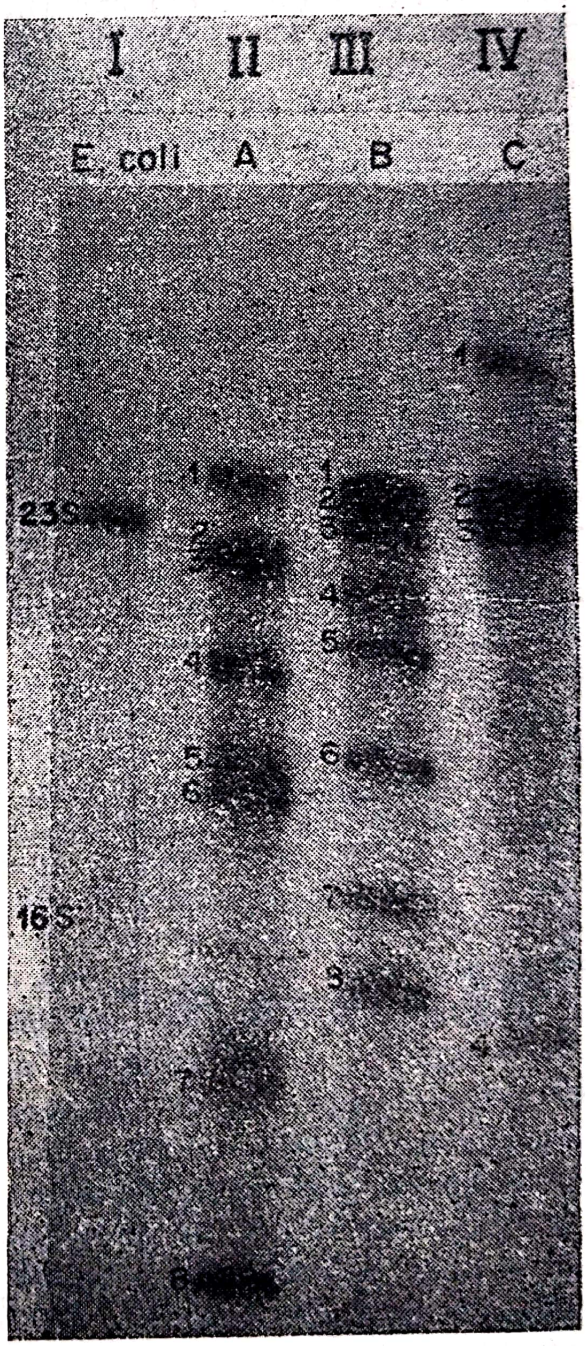


Fig. 5-1 — Genele celor trei tipuri (A, B, C) de virusuri gripale, puse în evidență prin electroforeza în gel de poliacrilamidă.

Coloana I — migrarea markerilor de masă moleculară (ARNr 23 S și ARNr 16 S de *E. coli*); *coloana II* — genele unui virus gripal A (A/PR 8/34/H_0N1); *coloana III* — genele unui virus gripal de tip B (Lee/40); *coloana IV* — genele unui virus gripal de tip C (C/GL/1167/54) (după Ritchey și colab., 1976).

a produce o nouă pandemie gripală (Palese și colab., 1978). Prezicerea s-a dovedit a fi fericită, ea fiind făcută în conformitate cu una dintre cele mai acceptate teorii privind originea noilor tulpini pandemice, care sugerează că acestea ar rezulta în urma recombinării între tulpini virale umane și animale (Laver și Webster, 1973).

Sensibilitatea deosebită a analizei permite studiul genetic al diferitelor tulpini de virus produse prin recombinări atît în natură, cît și în laborator. Precizăm că ea a constituit elementul principal cu ajutorul căruia s-a reușit descifrarea hărții genetice a genomurilor diferitelor virusuri gripale (Palese și colab., 1978).

La rîndul lor, rotavirusurile pot fi și ele foarte rapid caracterizate prin analiza electroforetică a genomului lor. În acest caz, ARN genomic poate fi extras direct din materiile fecale provenite de la pacienții infectați cu virus, fără a efectua o purificare prealabilă a virusurilor. Analiza este atît de simplă, încît ne permitem să o redăm : aproximativ 0,2 g fecale se diluează într-o soluție de fenol-cloroform, iar amestecul — după ce este agitat cîteva minute — este supus electroforezei în gel de poliacrilamidă 10%. Localizarea fragmentelor de ARN se face prin colorație argentică (La Torré și colab., 1984). O astfel de analiză este prezentată în fig. 5-2. Rotavirusurile conțin 11 segmente de ARN genomic, al căror aspect electroforetic sau „electroforetip“ este de două feluri : unul denumit de tip „lung“ (eșantioanele *I* și *IV* în fig. 5-2) și unul de tip

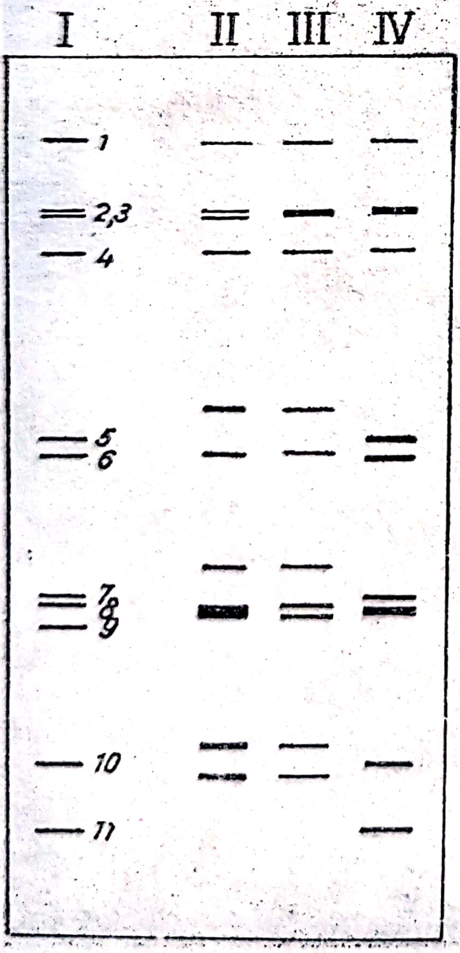


Fig. 5-2 — Genele unor rotavirusuri umane (eșantioanele *I—IV*), evidențiate prin analiza electroforetică în gel de poliacrilamidă (după La Torré și colab., 1984).

„scurt“ (eşantioanele *II* şi *III* în fig. 5-2). O clasificare oarecum diferită a rotavirusurilor au propus-o Lourenço şi colab. (1981), bazîndu-se pe mărimea celor 11 segmente ale genomului rotaviral. Autorii consideră că, în funcţie de asemănarea segmentelor ARN, aceste virusuri pot fi incluse în patru grupe diferite : grupa I include virusurile cu segmentele 1, 2, 3 şi 4 asemănătoare ; grupa a II-a — pe cele cu segmentele 5 şi 6 asemănătoare ; grupa a III-a — cele cu segmentele 7, 8 şi 9 asemănătoare, iar grupa a IV-a — cele cu segmentele 10 şi 11 asemănătoare. În ultimul timp, clasificarea rotavirusurilor se face însă după criteriul electroforetipului prezentat. Se preferă acest criteriu, mai ales datorită exactităţii şi simplităţii lui, dar şi datorită faptului că unele rotavirusuri nou-descoperite, denumite „pararotavirusuri“, pot fi decelate numai prin această metodă, ele avînd particularitatea de a nu fi detectabile prin metode de diagnostic imunochimic (ELISA). Caracteristicile pararotavirusurilor nu sînt încă suficient de cunoscute, dar se consideră că impactul lor epidemiologic va fi mare (La Torré şi colab., 1984).

5.2.2. HARTA OLIGONUCLEOTIDELOR SAU CARTOGRAFIA GENOMULUI PRIN METODA AMPRENTELOR (MAPAREA OLIGONUCLEOTIDELOR)

Metoda amprentelor oligonucleotidelor se utilizează atît pentru identificarea cu precizie a genomului viral ARN, cît şi pentru stabilirea variaţiilor sale genetice. Pe baza acestei metode s-a sugerat că recombinarea genetică reprezintă cel puţin unul din mecanismele prin care apar noile virusuri gripale în natură (Desselberg şi colab., 1978).

Protocolul metodei prevede în primul rînd purificarea şi marcarea cu ^{32}P a genomului viral. În cazul în care genomul este fragmentat (cum este cel al virusurilor gripale), analiza amprentelor se execută separat pe fiecare fragment de ARN. Totuşi, întrucît componentele de suprafaţă ale virusurilor gripale sînt cele mai variabile, analiza amprentelor se execută uneori numai asupra genelor care codifică componentele de suprafaţă, adică cele corespunzătoare hemaglutininei şi neuraminidazei.

Fragmentele de ARN ale genomului (genele) sînt separate electroforetic, apoi genele sînt extrase din gelul de poliacrilamidă 2,6% în care s-a făcut separarea, iar capătul lor 5′ se marchează cu [γ-^{32}]-ATP. În continuare, se efectuează hidroliza fragmentului de ARN cu RNaza T$_1$, enzimă care scindează ARN în dreptul guaninei (G-specifică). În urma hidrolizei cu RNază T$_1$ se obţin oligonucleotide cu lungimea cuprinsă între 1 şi 40 de nucleotide. Acestea sînt separate electroforetic în gel de poliacrilamidă, monodimensional sau bidimensional, a doua posibilitate fiind preferată. În acest caz, în prima dimensiune oligonucleotidele sînt separate în funcţie de sarcina lor, iar în a doua dimensiune — pe baza masei lor moleculare. După electroforeză, gelul este pus în contact cu un film sensibil la razele X, pentru a se face autoradiografia gelului. Autoradiografia poate fi fotografiată sau păstrată ca atare timp nede-

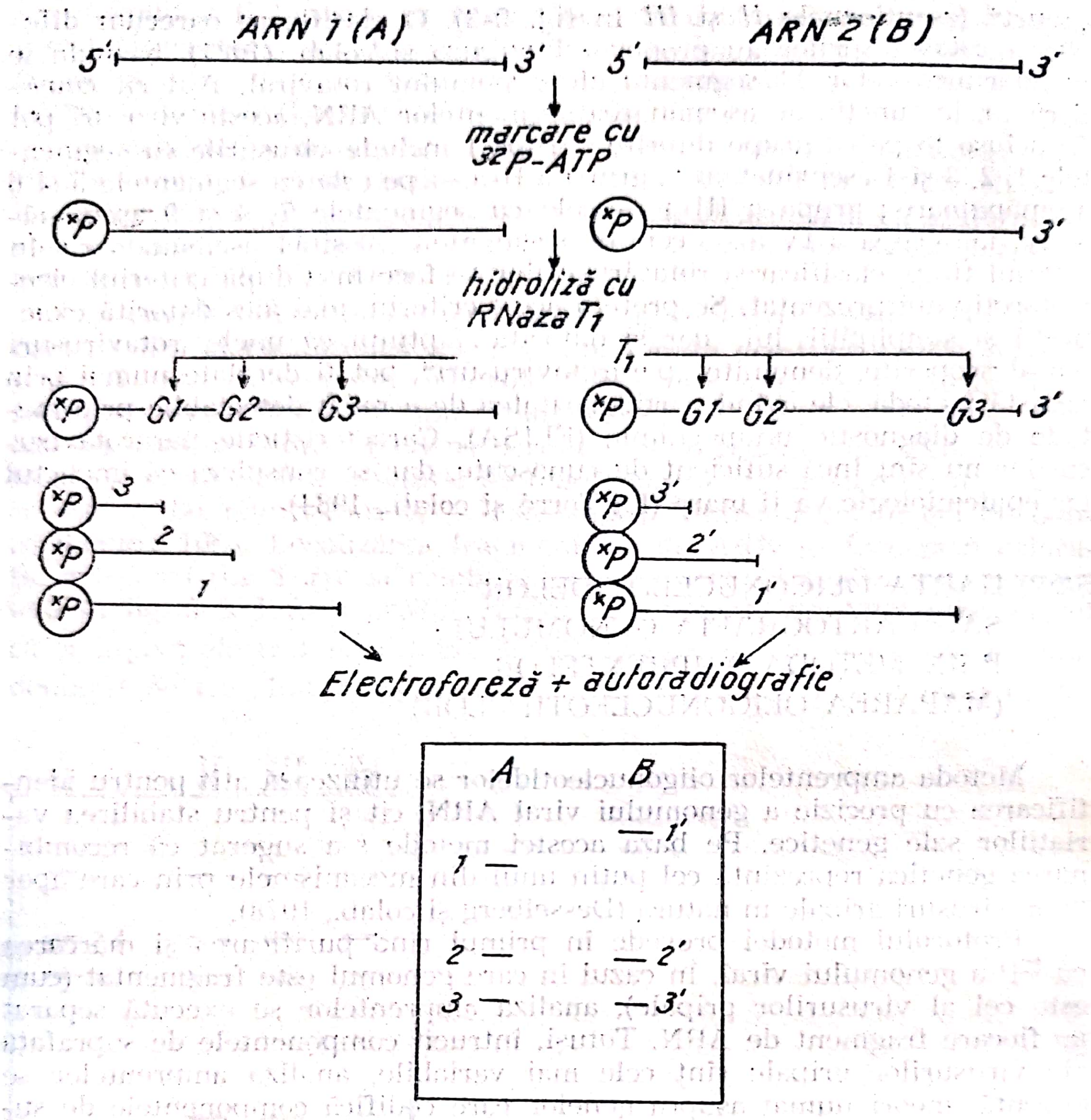

ARN 1 (A)
ARN 2 (B)
5'
3'
5'
3'
marcare cu
32P-ATP
xP
xP
3'
hidroliză cu
RNaza T1
T1
xP
G1
G2
G3
xP
G1
G2
G3
3'
xP
3
xP
2
xP
1
xP
3'
xP
2'
xP
1'
Electroforeză + autoradiografie
A
B
1'
1
2
2'
3
3'

Fig. 5-3 — Principiul cartării oligonucleotidelor. Pentru simplificare se prezintă cazul în care diferenţa între ARN de referinţă (ARN1) *(A)* şi ARN care urmează a fi identificat (ARN2) *(B)* constă într-o singură moleculă de guanină (G3), care în proba de referinţă este localizată spre mijlocul ARN, iar în proba necunoscută se află aproape de capătul 3'. Chiar şi această diferenţă minimă este uşor de evidenţiat prin electroforeza oligonucleotidelor produse prin acţiunea RNazei T_1 : prezenţa benzii 1' în locul benzii 1, pe autoradiografie.

finit. Ea este utilizată pentru compararea diferitelor genomuri între ele. Autoradiografiile sînt adesea utilizate de epidemiologi pentru identificarea unor noi virusuri apărute în teren. Cu ajutorul lor se pot decela foarte exact micile variaţiuni care apar în genomul viral. Fig. 5—3 prezintă schematic principiul metodei de cartare a oligonucleotidelor, iar fig. 5—4 redă imaginea reală a unor analize de oligonucleotide separate prin electroforeză bidimensională.

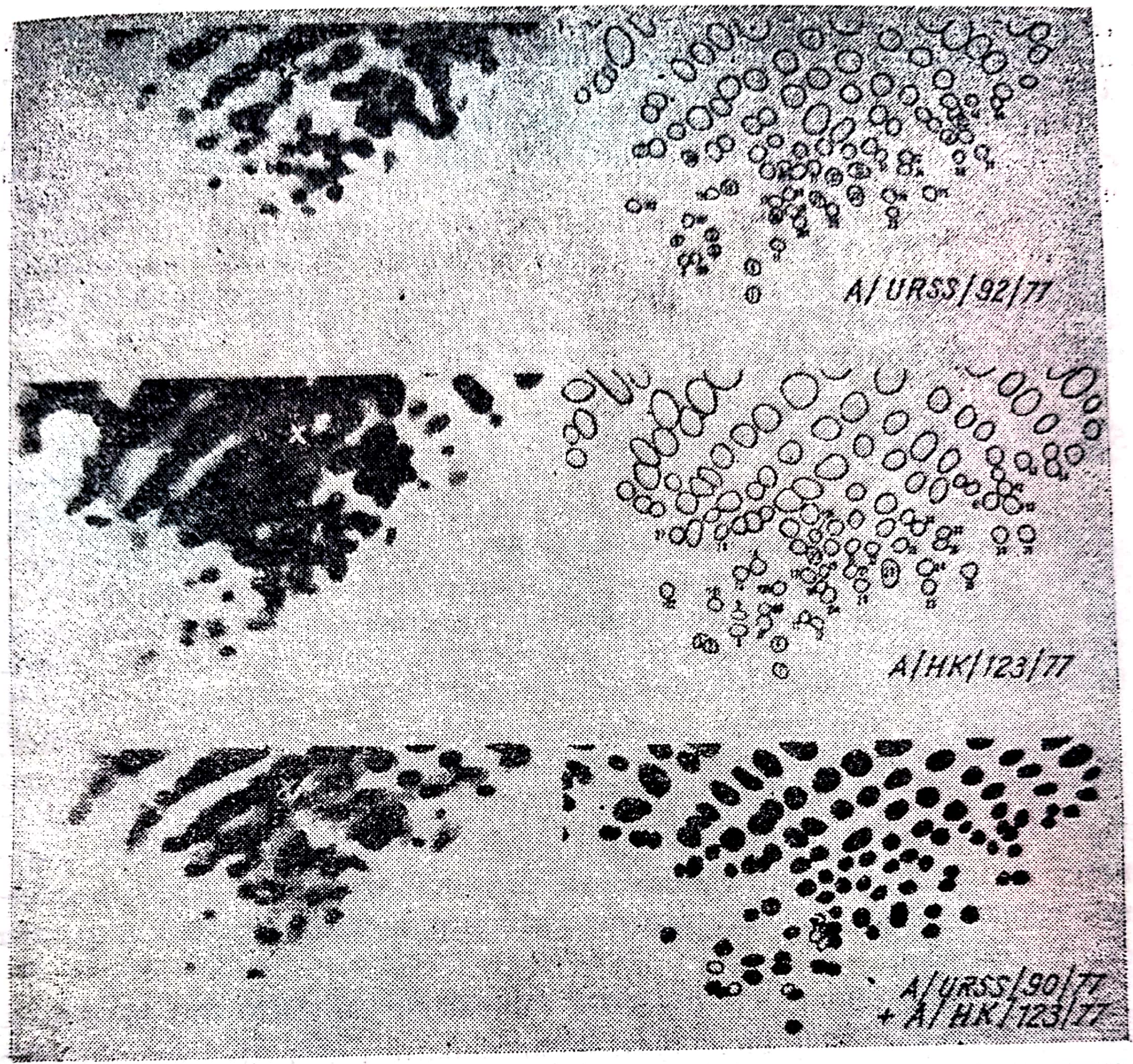


Fig. 5-4 — Harta oligonucleotidelor a două genomuri de virusuri gripale de H1N1 (A/URSS/92/77 şi A/HK/123/77), precum şi a unui amestec de ARN provenit de la două tulpini virale diferite (A/URSS/90/77 şi A/HK/123/77). Separarea oligonucleotidelor s-a făcut prin electroforeză bidimensională : prima dimensiune (de la stînga la dreapta) s-a efectuat la pH 3,5 în gel de poliacrilamidă 10%, iar a doua dimensiune (de jos în sus) s-a efectuat la pH 8 în gel de poliacrilamidă 21,8% (după Nakajima şi colab., 1978).

Metoda este larg răspîndită pentru caracterizarea virusurilor ARN. Ea a fost aplicată cu succes la studiul virusurilor gripale, polio-, rhabdo-, corona-, toga-, flavo-, retrovirusurilor, precum şi a grupului de virusuri implicate în febra hemoragică africană.

Astfel, cu ajutorul acestei metode s-a stabilit că virusurile gripale de tip A (H1N1), izolate în 1977, au fost din punct de vedere genetic foarte asemănătoare cu virusurile gripale H1N1 care au circulat cu 29 de ani în urmă, în 1950 (Nakajima şi colab., 1978). Totodată, cartarea oligonucleotidelor a dovedit că recombinările în interiorul subtipurilor de virusuri gripale H1N1 au loc şi în natură (Young şi Palese, 1979). Menţionăm şi faptul că prin această metodă s-a stabilit că incidența accidentală a poliomielitei a fost determinată de tulpini sălbatice de virusuri polio (Nattay și colab., 1981).

Referitor la această metodă trebuie precizat că RNaza T_1 determină ca o mare parte din oligonucleotidele rezultate să aibă o masă moleculară mică, iar acestea nu pot fi bine izolate nici chiar în electroforeza bidimensională. In consecință, variațiile incluse în aceste molecule mici nu sînt decelate. De regulă, se face chiar abstracție de aceste amprente și, așa cum se poate observa în fig. 5—4, amprenta oligonucleotidelor mari (cu mobilitate mai mică în gelul de poliacrilamidă) oferă suficiente informații pentru caracterizarea unui genom ARN.

5.2.3. HIBRIDIZAREA ARN—ARN

În cazul virusurilor ARN, informația genetică este determinată de secvența specifică a celor patru baze din genomul lor, care este unică pentru fiecare genă. Întrucît este practic imposibil ca o secvență de 20 de baze, de exemplu, să fie distribuită la întîmplare într-o anumită genă, există posibilitatea de a identifica o secvență definită de baze prin hibridizarea ei cu o probă complementară de acid nucleic (denumită „sondă").

Reacția de hibridizare a acizilor nucleici este extrem de specifică, motiv pentru care este frecvent utilizată atît pentru stabilirea structurii și funcției unor gene, cît și pentru diagnosticul exact al unor boli infecțioase. Pentru acele virusuri care sînt infectante, dar nu promovează exprimarea proteinelor lor, sau pentru acele virusuri care sînt integrate în genomul celulei-gazdă, hibridizarea este singura metodă utilizabilă pentru identificarea lor.

La fel ca și moleculele de ADN, moleculele de ARN sînt bicatenare sau monocatenare. Cele bicatenare se pot denatura ușor (de exemplu, prin încălzire), proces prin care legăturile de hidrogen dintre catene se rup, iar cele două catene devin independente, adică monocatenare. Dacă după încălzire *(denaturare)* moleculele sînt răcite brusc, ele rămîn sub forma monocatenară. În schimb, dacă după încălzire moleculele sînt lăsate să se răcească lent, ele se reasociază și restabilesc molecula bicatenară inițială (fig. 5—5).

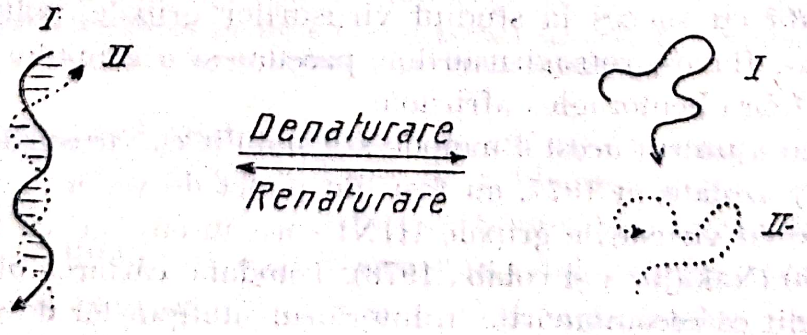


Fig. 5-5 — Procesul de denaturare și renaturare

Procesul invers denaturării se numește *renaturare*. Renaturarea stă la baza hibridizării, deoarece moleculele monocatenare obținute prin denaturare pot forma molecule bicatenare nu numai cu propriile lor catene, ci și cu alte molecule polinucleotidice monocatenare complementare străine, cu condiția ca acestea să prezinte omologii totale sau parțiale de secvențe de baze. În consecință, atunci cînd se constituie o moleculă bicatenară din catena unui acid nucleic și catena unui alt acid nucleic se realizează de fapt un hibrid, iar procesul se numește *hibridizare*.

Prin acest proces se pot realiza hibrizi de tip ARN—ARN, ARN—ADN și ADN—ADN, bineînțeles respectînd condiția menționată mai sus, și anume catenele polinucleotidice puse în contact să conțină secvențe de baze complementare.

În continuare ne vom ocupa doar de primul caz (hibridizare ARN—ARN), iar pentru exemplificare se va prezenta cazul caracterizării și identificării unor tulpini de virusuri gripale.

Metoda hibridizării poate fi utilizată în două variante. Prima variantă recomandă ca hibridizarea să se efectueze cu ARN extras dintr-o tulpină virală de referință și ARN complementar (ARNc) extras din virusul ce urmează a fi caracterizat, iar a doua recomandă ca hibridizarea să se realizeze între ARN viral izolat din virusul necunoscut și ARNc, izolat dintr-un virus de referință.

Ambele variante se bazează pe faptul că virusurile gripale au genomul reprezentat de ARN cu catenă negativă (adică ARN incapabil de a dirija sinteza proteinelor, deci fără funcție mesageră), care în celulele infectate dă naștere la un ARNc, implicat atît în sinteza proteinelor virale, cît și în sinteza ARN viral. Prin urmare, ARNc fiind complementar ARN viral, poate fi utilizat pentru identificarea unui ARN viral provenit dintr-o tulpină identică sau apropiată genetic.

Întrucît cele două variante sînt asemănătoare, vom descrie succint modul de lucru în cazul în care se utilizează ARN viral de referință (ARN cu catentă negativă) ca „sondă" și ARNc, izolat din tulpina virală ce urmează a fi caracterizată.

ARNc marcat cu ^{32}P se obține prin cultivarea virusului necunoscut în prezența [γ-^{32}P]-ATP și a cicloheximidei. După cum se știe, cicloheximida inhibă sinteza proteinelor celulare și virale, deci inhibă inclusiv sinteza replicazei virale, fără a afecta însă sinteza ARNc, care este promovată de transcriptaza virală, prezentă în toate virusurile ARN cu catenă negativă. Din celulele infectate se extrage și se purifică ARNc marcat, iar acesta este apoi hibridizat cu ARN viral (ARNv) de referință. Produsul obținut după hibridizare este mai întîi supus acțiunii unei ribonucleaze specifice, care acționează numai asupra regiunilor monocatenare ale ARN, iar apoi este analizat prin electroforeză în gel de poliacrilamidă și autoradiografic.

Examinarea autoradiografiei poate evidenția trei situații (fig. 5—6):

— tulpina virală analizată este identică cu tulpina de referință. În acest caz, autoradiografia relevă prezența unei singure specii moleculare (o singură bandă), corespunzătoare hibridului ARNc—ARNv care nu a fost afectat de acțiunea RNazei specifice regiunilor monocatenare ale ARN.

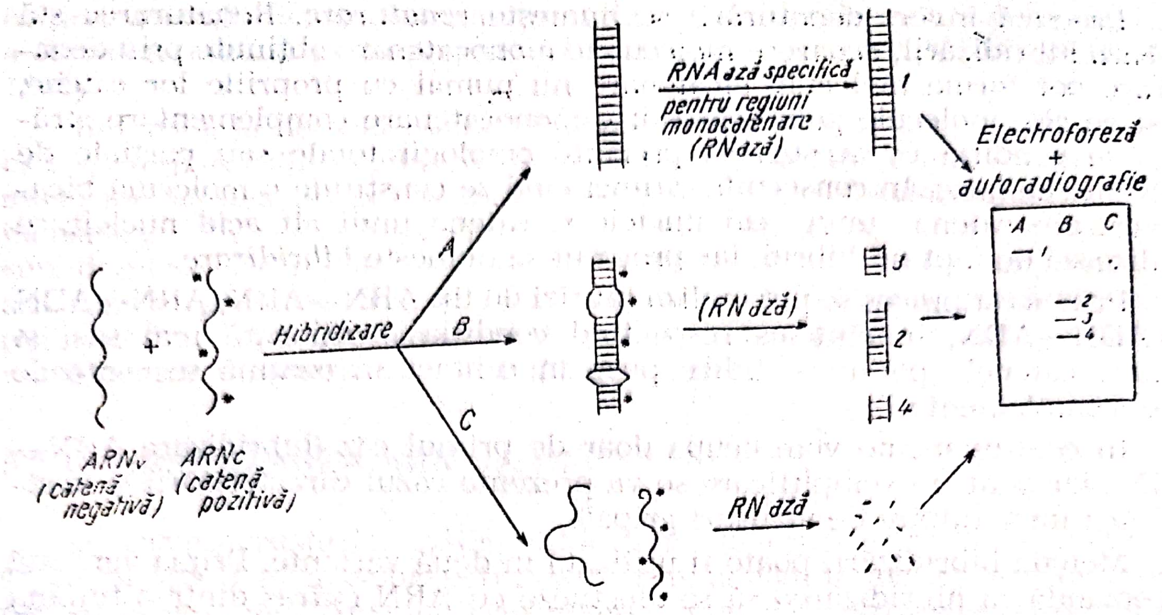


Fig. 5-6 — Hibridizarea de tip ARN—ARN. Se prezintă cele trei cazuri posibile: *A* — omologie 100% între ARNv de referință și ARNc provenit de la un virus ce urmează a fi caracterizat; *B* — omologie parțială; *C* — între virusul de referință și cel studiat nu există nici o asemănare. De precizat că genomul unui virus gripal are opt segmente, iar schema se referă doar la un astfel de segment. Reacția de hibridizare se poate face atît cu un segment, cît și cu toate segmentele deodată.

Se poate trage deci concluzia că avem de-a face cu omologie totală (100%) între proba de referință și proba de analizat (*A*);

— tulpina virală analizată este „înrudită" cu tulpina virală de referință. În acest caz, autoradiografia arată prezența mai multor benzi, fiecare bandă reprezentînd cîte un fragment bicatenar rezistent la acțiunea endonucleazei specifice regiunilor monocatenare. Cunoscînd radioactivitatea ARNc utilizat la hibridizare și măsurînd radioactivitatea produsului rezistent la acțiunea enzimatică, se poate ușor stabili procentul de omologie a ARN din virusul analizat, comparativ cu virusul de referință (*B*);

— tulpina virală analizată nu are nimic comun cu tulpina de referință. Pe autoradiografie nu apare nici o bandă clar definită, întrucît catenele minus (ARNv) și catenele plus (ARNc) nu s-au hibridizat și au fost total hidrolizate de către enzimă (*C*).

5.2.4. DETERMINAREA SECVENȚELOR DE NUCLEOTIDE

Această analiză prezintă gradul maxim de complexitate, motiv pentru care ea este folosită doar în laboratoarele unor institute de cercetare bine utilate, cu scopul de a stabili structura primară a unor genomuri virale, adică modul exact în care cele patru nucleotide ale acidului nucleic viral sînt aranjate pentru a forma macromolecula polinucleotidică. Analiza are o valoare capitală pentru caracterizarea unui anumit virus, deoarece în momentul în care s-a reușit determinarea secvenței nucleotidelor unui genom viral, iar această secvență este întotdeauna unică, „identitatea virusului" poate fi considerată definitiv stabilită. În plus, din rezultatele analizei de secvențe de baze se pot prezice automat :

— numărul și localizarea genelor în genom, întrucît fiecare început și sfîrșit de genă este marcat de o anumită secvență de nucleotide ;

— regiunile care sînt transcrise în ARN mesageri — așa-numitele *„open reading frames"* (ORF) ;

— secvențele aminoacizilor din proteinele virale ;

— determinanții antigenici din proteinele virale etc.

Determinarea secvențelor de nucleotide dintr-un genom viral ARN, indiferent de mărimea lui, poate fi efectuată prin mai multe metode. Astfel, analiza poate fi realizată direct asupra genomului, prin secvențializarea bazelor ARN, sau indirect, copiind (cu reverstranscriptază) întîi genomul ARN în complementarul său, adică într-un ADN complementar (ADNc), care apoi este secvențializat prin metodele specifice pentru moleculele de ADN.

Dintre metodele directe, cele mai cunoscute sînt cele recomandate de Simoncsits și colab. (1977), Donis-Keller (1979) și Peattie (1979), iar dintre cele indirecte, metoda Maxam și Gilbert (1977) și metoda Sanger și colab. (1977), adresîndu-se de fapt moleculelor de ADN și fiind prezentate succint în subcapitolul 5.3.4. al acestui capitol.

Revenind la *metodele directe*, precizăm că ele sînt de două feluri — *enzimatice* și *chimice* :

Metodele enzimatice se bazează pe proprietățile RNazelor de a scinda specific moleculele de ARN. Astfel, RNaza T_1 scindează ARN în dreptul guaninei (G), RNaza U_2 scindează în dreptul adeninei (A), RNaza pancreatică scindează în dreptul uracilului (U) și citozinei (C), iar RNaza izolată din *Physarum polycephalum (Phy*I*)* scindează ARN în dreptul A, G și U. Această ultimă RNază permite stabilirea poziției lui C, motiv pentru care este denumită și RNaza „minus C" specifică. Efectuîndu-se separat, cele patru hidrolize asupra ARN marcat la un capăt cu ^{32}P și analizîndu-se prin electroforeză în gel de poliacrilamidă produsele de reacție, se poate stabili exact secvența bazelor din ARN viral analizat.

Metodele chimice de secvențializare a ARN au derivat din cele puse la punct pentru moleculele de ADN. Practic, singura diferență care există între metodele chimice specifice pentru ARN și ADN constă în modul de scindare aplicat celor două specii de molecule. Moleculele de ARN fiind mai labile decît cele de ADN, condițiile de reacție pentru cele patru baze din ARN trebuie să țină cont de această particularitate structurală.

În cazul secvențializării ARN prin metoda chimică, se preconizează efectuarea a patru reacții specifice (Peattie, 1979) :

1. *reacția cu guanina.* ARN se metilează cu dimetilsulfat, iar apoi tratamentul cu borohidrură de sodiu și anilină scindează molecula în dreptul G ;

2. *reacția cu adenina și guanina.* Ciclurile imidazolice ale A și G se deschid în urma reacțiilor cu dietilpirocarbonatul de sodiu. Acest tratament conduce la ruperea legăturilor internucleotidice în dreptul A și G. Întrucît dietilpirocarbonatul reacționează de șapte ori mai repede cu A decît cu G, benzile intense pe autoradiografie sînt date de ruperea la nivelul A, iar benzile slabe vor indica ruperea la nivelul G ;

3. *reacția cu citozina și uracilul*. Cu toate că hidrazina atacă preferențial U din ARN, în prezența NaCl 3M reacția cu U este parțial inhibată, în schimb hidrazinoliza C este stimulată. Tratamentul ulterior cu anilină produce scindarea ARN în dreptul celor două pirimidine ;

4. *reacția cu uracilul*. Tratamentul cu hidrazină anhidră sau apoasă, urmat de cel cu anilină, determină scindarea ARN în dreptul U.

Detalii suplimentare privind modul de utilizare a acestor reacții în analiza de secvențializare vor fi prezentate cu ocazia descrierii metodei Maxam și Gilbert (1977).

5.3. METODE DE CARACTERIZARE A GENOMURILOR ADN

5.3.1. ANALIZA ELECTROFORETICĂ ÎN GEL DE AGAROZĂ

Virusurile ADN, al căror genom este mic, pot fi ușor identificate și caracterizate prin analiza electroforetică în gel de agaroză a moleculei lor de ADN. Această moleculă poate fi izolată din virusul purificat sau din celulele infectate cu virus, iar apoi este analizată electroforetic, utilizînd pentru comparație markeri cu conformație și masă moleculară cunoscută. În acest fel se pot caracteriza, de exemplu, genomurile virusurilor Papova sau genomul virusului hepatitei B.

Pentru exemplificare, vom prezenta modul de caracterizare a genomului virusului simian 40. Din celulele de tip CV—1 sau BSC, infectate cu SV40 se izolează virusul, iar apoi din acesta se extrage și purifică ADN viral. În continuare, ADN este supus electroforezei în gel de agaroză 1,2%. Întrucît molecula genomică de ADN-SV40 se găsește în conformație de cerc covalent închis (CCI), iar această moleculă este uneori parțial convertită în conformație de cerc deschis (CD), materialul analizat, de regulă, migrează în gelul de agaroză sub forma a două benzi. Banda cu mobilitatea mai mare reprezintă moleculele intacte de ADN genomic aflate în conformație CCI, iar banda cu mobilitatea mai mică — moleculele în conformație CD. Cu toate că migrează diferit, cele două specii moleculare au aceeași masă moleculară, fapt ușor de verificat prin tratarea preparatului de ADN viral cu enzima de restricție *Eco* RI ; în urma tratamentului apare o singură bandă, deoarece enzima clivează ambele specii moleculare în același loc (ADN-SV40 conține un singur situs pentru *Eco* RI), convertindu-le într-o moleculă liniară, o altă conformație posibilă a ADN-SV40.

Pentru a estima masa moleculară a unui ADN oarecare prin electroforeză, este necesar ca analiza acestuia să se facă simultan cu cea a unor molecule de ADN cu masă moleculară cunoscută (markeri de masă moleculară cunoscută). Totodată, se impune condiția ca markerii utilizați să aibă aceeași conformație moleculară ca și ADN ce urmează a fi caracterizat, deoarece — așa cum s-a precizat mai sus — moleculele de ADN cu aceeași masă moleculară, aflate însă în conformații diferite, au mobilități electroforetice total diferite. Pentru estimarea corectă a maselor moleculelor de ADN care pot prezenta cele trei conformații amintite (CCI, CD și liniară), înainte de electroforeză ADN este convertit la forma liniară, a cărei mobilitate este comparată cu mobilitatea markerilor. În cercetările de biologie moleculară, inclusiv în cele de inginerie genetică, markerii de masă moleculară utilizați de obicei sînt cele șase fragmente de ADN λ rezultate în urma hidrolizei ADN din fagul λ cu enzima de restricție *Eco* RI. Aceste fragmente au următoarele mase moleculare: 12×10^6, 4×10^6, $3,3\times10^6$ (două fragmente), $2,7\times10^6$ și $2,1\times10^6$ daltoni. Reprezentarea maselor moleculare ale fragmentelor de ADN λ pe scara logaritmică, în funcție de mobilitatea lor electroforetică (exprimată în centimetri), permite obținerea unui grafic cu ajutorul căruia se poate determina masa moleculară relativă a moleculelor de ADN necunoscute, în conformație liniară, în domeniul 1×10^6—20×10^6 daltoni.

Aplicînd această metodă la caracterizarea ADN-SV40 izolat de noi, am ajuns la concluzia că masa lui moleculară este de 3×10^6 daltoni, valoare identică cu cea stabilită de alți autori prin același procedeu sau prin ultracentrifugare analitică (fig. 5—7).

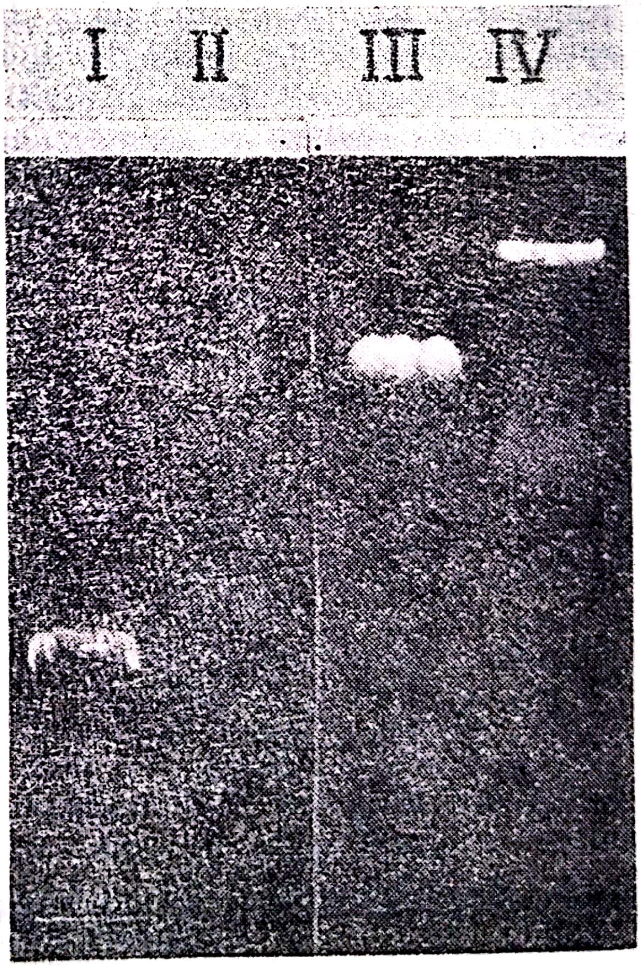


Fig. 5-7 — Analiza electroforetică în gel de agaroză a ADN extras din virusul SV40.
Coloana IV — ADN-SV40 ca atare: banda de sus reprezintă ADN aflat în conformație CCI, iar banda de jos ADN în conformație CD; *coloana III* — ADN-SV40 tratat cu enzima de restricție *Eco* RI (forma liniară); *coloana II* — fragmentele de ADN rezultate în urma acțiunii enzimei de restricție *Eco* RI asupra ADN izolat din fagul λ; *coloana I* — ADN din fagul λ ca atare, nehidrolizat (după Popa și colab., 1985).

5.3.2. ANALIZA DE RESTRICȚIE

Întrucît genomurile virale mari sînt greu sau chiar imposibil de analizat ca atare, în cazul lor se preferă studiul fragmentelor generate în urma acțiunii enzimelor de restricție asupra acestor molecule. În esență analiza de restricție a unui genom viral ADN constă în a efectua hidroliza lui cu o anumită enzimă de restricție, urmată de separarea fragmentelor pe gel de agaroză, pentru a compara numărul și dimensiunea lor cu fragmentele unui genom de referință, hidrolizat în aceleași condiții experimentale și cu aceeași enzimă de restricție. Dacă fragmentele genomului analizat sînt identice cu cele ale genomului de referință, înseamnă că cele două molecule sînt și ele identice.

Construcția „hărții de restricție“ a unui genom viral. În acest moment, analiza moleculară a unui genom viral nu poate fi realizată fără a cunoaște exact locurile de clivare a genomului de către principalele enzime de restricție, ceea ce de fapt constă în a construi „harta de restricție“ pentru aceste enzime. Pe această hartă se prezintă, în raport cu locul de clivare a unei enzime de restricție care scindează genomul doar într-un singur loc, pozițiile de clivare a altor enzime de restricție. De exemplu, genomul virusului SV40 este clivat de enzima *Eco* RI într-un singur loc, iar acest loc este luat în mod arbitrar ca origine a hărții de restricție și, în funcție de el, pe hartă se mapează celelalte locuri la care hidrolizează alte enzime de restricție. În fig. 5—8 prezentăm „harta de restricție“ a genomului SV40, stabilită în urma hidrolizei sale cu trei enzime de restricție (*Eco* RI, *Hpa* și *Hin*) (*a*) și „harta de restricție“ a genomului virusului hepatitei de tip B (*b*) stabilită în urma hidrolizei sale cu enzimele de restricție *Eco* RI, *Bam* HI, *Bgl*II, *Xho*I. În cazul genomului virusului SV40, prima enzimă — așa cum am precizat mai sus — scindează mole-

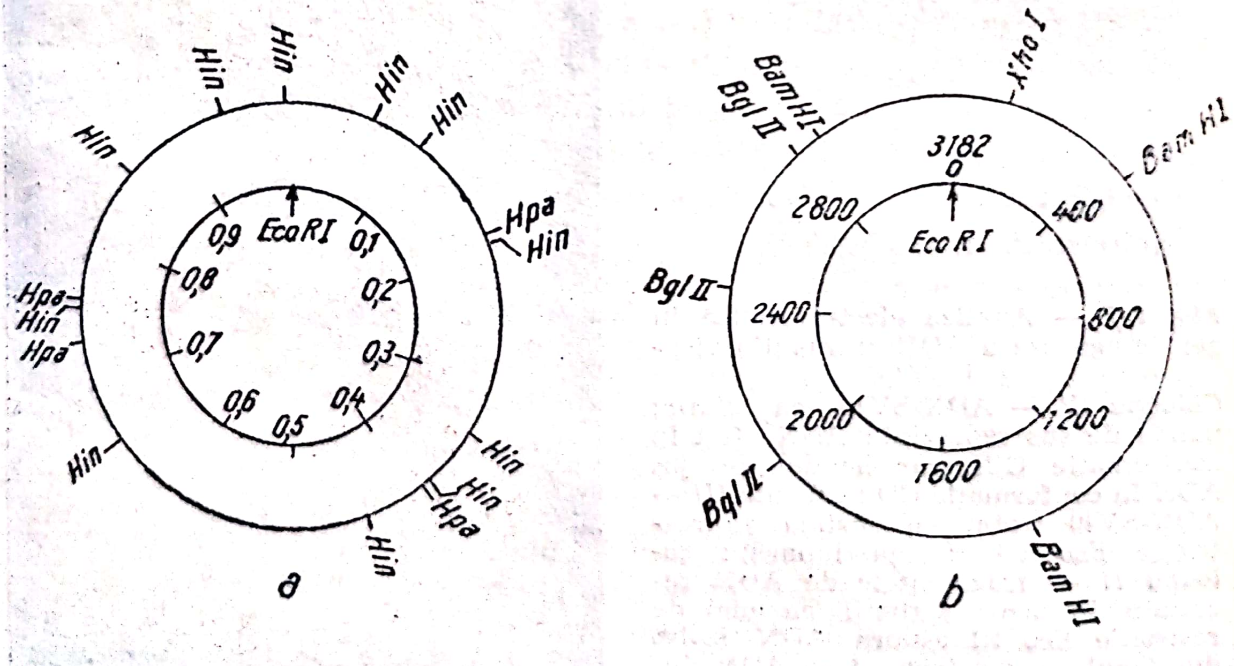


Fig. 5-8 — Harta de restricție simplificată a genomului SV40 (*a*) și a genomului virusului hepatitei B (*b*).

cula într-un singur loc, a doua în patru, iar ultima — în 11 locuri. Trebuie menționat că enzima *Hin* s-a dovedit a fi compusă din două enzime (*Hind*II *și Hind*III), iar cele 11 fragmente au rezultat în urma acțiunii celor două componente enzimatice. Ordinea fragmentelor în genom se stabilește prin mai multe procedee, dintre care digestia secvențială și dubla digestie sînt cele mai des folosite.

Odată ce harta de restricție este stabilită, ea servește atît la stabilirea hărții genetice (precizarea poziției diferitelor gene), cît și la identificarea genomului într-un preparat viral oarecare.

5.3.3. HIBRIDIZAREA MOLECULARĂ ADN—ADN

Așa după cum am menționat anterior, această tehnică — în diferitele ei variante — este din ce în ce mai mult practicată în laboratoarele de biologie moleculară, în general, și în cele de virusologie, în special, pentru a identifica moleculele de ARN și ADN. Ea se bazează pe proprietatea catenelor complementare (de ADN sau ARN) de a se hibridiza, adică de a forma molecule bicatenare helicoidale în baza atracției specifice pe care o exercită nucleotidele guanilice dintr-o catenă asupra nucleotidelor citidilice din cealaltă catenă și a nucleotidelor adenilice asupra nucleotidelor timidilice aflate în cealaltă catenă. De fapt, atracția dintre nucleotidele complementare G—C și A—T este responsabilă de formarea celebrei duble elice Watson-Crick, constituită din două catene cu secvențe complementare.

În cazul special al identificării unui anumit virus prin tehnica hibridizării moleculare, trebuie să dispunem în primul rînd de genom sau de unele fragmente din genomul virusului de referință. Genomul sau fragmentele genomice de referință sînt marcate cu un izotop radioactiv, așa încît interacțiunea lor cu genomul virusului care urmează să fie identificat să poată fi pusă în evidență în urma hibridizării, prin autoradiografie, sub forma unui spot.

Procesul de hibridizare se desfășoară de regulă pe un suport solid, și anume pe o hîrtie de nitroceluloză, care este suficient de rezistentă pentru a permite efectuarea reacțiilor de denaturare și hibridizare. Cu ajutorul acestei tehnici se poate detecta prezența genomului viral în diferite celule și se poate aprecia dacă acest genom este liber sau se află încorporat în genomul celular. În ultimii ani, astfel de analize au fost puse la punct pentru identificarea virusului hepatitei B (Berlinger și colab., 1982), a virusului Epstein-Barr (Brandsma și Miller, 1980), precum și pentru virusul citomegalic (Chou și Merigan, 1983) etc.

Identificarea prezenței genomului virusului hepatitei B în celule hepatice sau în sînge. Genomul virusului hepatitei B (conținînd 3,2 kiloperechi de baze) a fost clonat în bacteria *E. coli* de mai mulți cercetători, printre care Galibert și colab. (1979), fapt care permite obținerea de cantități practic nelimitate de material de referință pentru hibridizare. Genomul extras din celulele de *E. coli*, cultivate în prezența izotopului radioactiv ^{32}P, servește ca „sondă“ moleculară la identificarea genomului liber sau integrat.

Operațiunile principale care se efectuează sînt următoarele : se extrage ADN total din celulele hepatice sau din sînge. O parte din acest ADN rămîne nehidrolizată, în timp ce cea mai mare parte este hidrolizată cu enzima de restricție *Hind*III (jumătate din produs) și cu enzima de restricție *Eco* RI (a doua jumătate din produs). Atît produsul nehidrolizat, cît și cel hidrolizat sînt supuse electroforezei în gel de agaroză, pentru separarea fragmentelor de ADN sau a genomului liber, în cazul probei nefragmentate. Proba de ADN nehidrolizată este utilizată pentru identificarea genomului viral liber, deci a prezenței particulelor virale întregi, din celulele hepatice sau din sînge, în timp ce probele hidrolizate vor preciza dacă genomul viral este integrat în genomul celular al celulelor hepatice. Dacă se examinează gelul de agaroză după electroforeză și după îmbibarea lui într-o soluție de bromură de etidiu, pentru localizarea benzilor de ADN, se observă că proba nehidrolizată conține tot ADN adunat pe start, iar probele hidrolizate — datorită mulțimii fragmentelor pe care le conțin — arată ca niște comete. Identificarea genomului viral liber sau integrat se realizează prin tehnica de hibridizare recomandată de Southern (1975). În acest scop, gelul de agaroză este plasat peste o coală de nitroceluloză, așa încît o parte din ADN și din fragmente se transferă din gel pe hîrtie. Foaia de nitroceluloză se comportă ca o sugativă, atrăgînd pe suprafața ei moleculele sau fragmentele de ADN. Apoi, se denaturează moleculele de pe nitroceluloză, convertindu-le în molecule monocatenare, care în această stare sînt tratate cu „sonda“ de ADN viral, pentru hibridizare. De notat că, înainte de hibridizare, sonda este, la rîndul ei, convertită prin denaturare la forma monocatenară. În continuare, nitroceluloza se acoperă cu un film fotografic, care are rolul de a localiza moleculele sau fragmentele de ADN de pe foaia de nitroceluloză, hibridizate cu sonda radioactivă. Locul hibridizării este marcat pe film prin apariția unor benzi negre, iar poziția și numărul benzilor negre precizează natura lor. Astfel, apariția unei singure benzi în dreptul poziției moleculelor de ADN de 3,2 kiloperechi de baze, în proba nehidrolizată, este o indicație clară că celulele hepatice sau sîngele analizat conțin genomul virusului hepatiei B sub formă liberă. De precizat că această probă mai conține o bandă foarte aproape de start, corespunzătoare ADN total nehidrolizat. Pe de altă parte, apariția unei singure benzi, în proba hidrolizată cu enzima de restricție *Hind*III, și a două benzi, în proba tratată cu *Eco* RI, dovedește că genomul viral a fost integrat în genomul celulelor hepatice. Originea benzilor din probele hidrolizate este următoarea : enzima de restricție *Hind*III hidrolizează ADN celular în foarte multe fragmente, iar unul dintre acestea — cel care s-a hibridizat cu sonda — a rezultat în urma hidrolizei ADN celular la două situsuri situate în vecinătatea celor două capete ale genomului viral integrat. Schema din fig. 5—9 permite înțelegerea apariției acestui fragment. În ceea ce privește originea celor două benzi prezente la proba hidrolizată cu enzima *Eco* RI, precizăm că ele provin în urma scindării ADN celular în trei locuri : unul situat în mijlocul genomului viral integrat, iar celelalte două — în genomul celular, aproape de capetele genomului viral integrat. Întrucît cele două locuri de clivare din genomul celular nu se găsesc la o distanță egală față de locul de clivare din mijlocul genomului viral, vor rezulta două frag-

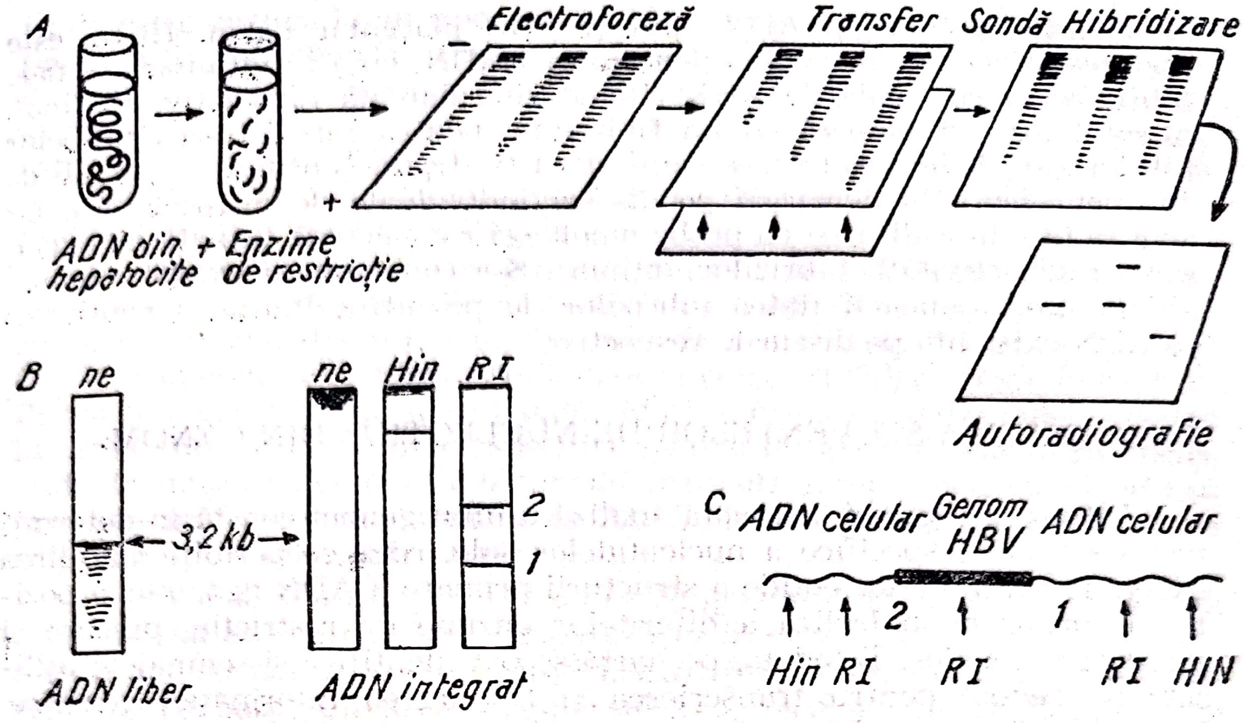

A
Electroforeză
Transfer
Sondă
Hibridizare
+
ADN din hepatocite
+ Enzime de restricție
Autoradiografie
B
ne
ne
Hin
RI
3,2 kb
2
1
ADN liber
ADN integrat
C
ADN celular
Genom HBV
ADN celular
2
1
Hin
RI
RI
RI
HIN

Fig. 5-9 — Prezentarea schematică a procedeului de identificare a genomului virusului hepatitei B, liber sau integrat, prin metoda hibridizării (după Tiollais și Dejean, 1985).

mente inegale : unul mai mic, corespunzător benzii de jos, și altul mai mare, precizat de banda de sus.

Analizele de hibridizare de acest fel au precizat că genomul HBV liber se pune în evidență atît în hepatitele acute, cît și în cele cronice, fiind rareori prezent în cancerele hepatice (Tiollais și Dejean, 1985). Aceiași autori precizează că integrarea genomului viral devine o regulă în cancerul de ficat, precum și în unele hepatite cronice și în ciroză. Etapele principale privind identificarea genomului HBV liber sau integrat sînt prezentate schematic în fig. 5—9.

Identificarea rapidă a virusului citomegalic. Cercetările efectuate de Chou și Merigan (1983) au arătat că se pot detecta chiar și 5 pg de ADN din virusul citomegalic prin tehnica hibridizării, în aproximativ 75 de celule. Sonda de hibridizare se obține astfel : din genomul virusului citomegalic, fragmentat cu enzima *Eco* RI, se separă fragmentul de $4{,}6\times10^6$ daltoni, denumit fragment *Eco* RI0 și care reprezintă o porțiune din secvența repetitivă situată la capătul unic lung al genomului. Acest fragment a fost clonat în *E. coli* cu ajutorul plasmidei pAcYC184. Pentru a fi utilizat ca sondă, fragmentul *Eco* RI0 este recuperat prin digestia plasmidei cu enzima de restricție *Eco* RI, urmată de o separare electroforetică preparativă în gel. Apoi, fragmentul este marcat cu ^{32}P prin „*nick translation*“, obținîndu-se o activitate specifică de 3×10^8 ppm*/μg. Testul de specificitate se realizează în modul următor : pe hîrtia de nitroceluloză se depun diferite cantități de celule umane, neinfectate și infectate cu virus citomegalic, precum și ADN viral și ADN placentar uman. Hîrtia este apoi tratată cu alcalii pentru denaturarea ADN, iar în continuare se face hibridizarea cu sonda de ADN citomegalic marcată radioactiv. În final, nitroceluloza se acoperă cu un film foto, pentru înregistrarea probelor hibridizate. Pentru estimarea cantitativă se depun cantități cunoscute de fragment *Eco* RI0 nemarcat pe discuri individuale de nitroceluloză, iar apoi se face hibridizarea cu proba omoloagă radioactivă, urmată de măsurarea radioactivității hibrizilor obținuți. S-a constatat că există o relație liniară între radioactivitatea hibrizilor de pe nitroceluloză și cantitatea de ADN existentă pe discurile respective.

---

* ppm=părți per milion.

5.3.4. ANALIZA SECVENȚELOR DE NUCLEOTIDE DIN GENOM

Ultima și cea mai completă analiză a unui genom constă în determinarea secvenței specifice a nucleotidelor sale, ceea ce permite stabilirea exactă la nivel de nucleotide a structurii primare a ADN genomic, a poziției locurilor de hidroliză a diferitelor enzime de restricție, precum și localizarea genelor. Totodată, pe hartă se pot identifica și semnalele utilizate de genom pentru transcrierea și traducerea informației genetice. Numai după ce s-a obținut harta completă a nucleotidelor se poate considera că un genom este perfect cunoscut sau identificat. Analizele de secvență a nucleotidelor nu se pot efectua direct pe genom, întrucît metodele de secvențializare propriu-zisă a ADN se aplică numai fragmentelor de ADN. În consecință, genomul viral trebuie în primul rînd hidrolizat (fragmentat) cu enzime de restricție, iar apoi aceste fragmente se analizează separat, în vederea determinării ordinii secvenței nucleotidelor din interiorul lor. Rezultatele obținute pentru fiecare fragment în parte sînt apoi puse cap la cap, în vederea obținerii secvenței totale a nucleotidelor din genomul respectiv.

Pentru a avea o cantitate suficientă dintr-un fragment de genom în scopul efectuării analizei de secvențializare, fragmentele genomului sînt clonate în prealabil în bacteria *E. coli*, cu ajutorul unor vectori adecvați. În ultimii ani s-au construit vectori care asigură atît clonarea eficientă a fragmentelor de ADN, cît și secvențializarea lor. Cei mai potriviți vectori de acest fel s-au dovedit a fi cei construiți de Messing și colab. (1981), din genomul fagului M13. În acest scop, în genomul fagului M13, autorii au introdus locuri multiple de clonare și, în același timp, au atașat un marker cu ajutorul căruia se pot deosebi fagii recombinați de cei parentali. Markerul constă dintr-o porțiune de operon *lac*, conținînd promotorul, operatorul și secvențele de ADN care codifică ultimii 145 de aminoacizi N-terminali ai beta-galactozidazei, care a fost introdusă într-o regiune neesențială a genomului. În momentul în care un fag astfel pregătit infectează o tulpină de *E. coli* defectivă în gena beta-galactozidazei (defectul constînd în deleția regiunii care codifică aminoacizii 11—41), prin complementare tulpina va produce beta-galactozidază activă. În consecință, coloniile *gal*$^+$ pot fi ușor identificate în plăcile de agar conținînd indicatorul X-*gal* (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranozid), deoarece indicatorul este convertit de către enzimă la un colorant albastru (bromo-cloro-indol). Pe de altă parte, fagii recombinați care conțin fragmentul de ADN viral inserat într-unul din multiplele locuri pe care le conține genomul nu au posibilitatea de a complementa gena beta-galactozidazei defecte a gazdei, motiv pentru care coloniile pe care le vor genera vor avea culoarea albă pe plăcile de agar conținînd X-*gal*. În felul acesta se realizează detecția clonelor generate de fagii (vectorii) recombinați.

În ultimii 10 ani s-au propus mai multe metode pentru determinarea secvențelor de nucleotide din moleculele de ADN. Dintre acestea, cele mai cunoscute și mai des utilizate sînt metoda propusă de Maxam și Gilbert (1977) și metoda preconizată de Sanger și colab. (1977) *(metode indirecte)*. Prima este considerată ca o *metodă chimică*, deoarece secvențele se deduc în urma unor reacții chimice specifice pentru fiecare din cele patru nucleotide, în timp ce a doua este o *metodă enzimatică*, secvențele stabilindu-se prin stoparea creșterii catenelor de ADN, dirijată de ADN polimerază, pe rînd în dreptul celor patru baze.

Metoda Maxam-Gilbert. Fragmentul de ADN care urmează a fi analizat se marchează la capătul său 5' cu ^{32}P, iar apoi fragmentul este tratat cu patru reactivi diferiți, care fragmentează ADN în dreptul celor patru baze. Clivarea fragmentului se face parțial la fiecare bază (A, T, C, G), așa încît rezultă produse de reacție a căror mărime se extinde de la capătul marcat pînă la baza respectivă. În continuare, produsele de reacție sînt separate electroforetic în gel de poliacrilamidă, ceea ce permite stabilirea lungimii lor. Puterea de rezoluție a gelului este atît de mare, încît permite punerea în evidență a unor diferențe de lungime determinate chiar de o singură bază. Produsele fiind marcate radioactiv pot fi puse în evidență prin autoradiografia gelului. Pe filmul autoradiografic, fiecare produs de reacție apare sub forma unei benzi, a cărei poziție față de start este determinată de lungimea produsului care a generat-o. Precizăm că mobilitatea electroforetică a produselor de reacție este invers proporțională cu lungimea lor în nucleotide.

În scopul îndepărtării unor ambiguități care apar la citirea secvențelor prin aplicarea metodei originale, autorii au propus, în 1979, unele modificări ale protocolului de efectuare a reacțiilor chimice. Astfel, în loc de patru reacții specifice, cît prevede varianta originală, cea nouă include următoarele șase reacții:

a) reacția $G+A$. Tratarea ADN cu formiat de piperidină timp de 60 min, la 37°C, determină clivarea în dreptul guaninei și adeninei;

b) reacția $A>C$. Hidroliza ADN cu NaOH 1,2 N, timp de 45 min, la 90°C, scindează molecula atît în dreptul adeninei, cît și în dreptul citozinei. Deoarece hidroliza are loc preferențial la nivelul adeninei, pe autoradiografie benzile intense sînt date de scindările la adenină, iar benzile mai puțin intense sînt date de clivarea la citozină. Din acest motiv reacția se notează $A>C$;

c) reacția G. În condiții experimentale speciale, reacția de metilare și scindare a ADN tratat cu dimetilsulfat are loc numai în dreptul guaninei;

d) reacția $C+T$. Această reacție se efectuează prin tratarea ADN cu hidrazină timp de 35 min la 20°C;

e) reacția C. În prezența NaCl 5 M reacția hidrazinei cu timina este total inhibată, iar reacția cu citozina este optimă ;

f) reacția T. Reacția aceasta se realizează prin tratarea ADN cu piperidina, la 25°C, timp de 45 min.

După ce s-au efectuat reacțiile specifice menționate mai sus, produsele de reacție sînt analizate cu ajutorul electroforezei în gel de poliacrilamidă, iar din benzile apărute în urma autoradiografiei gelului se poate deduce secvența nucleotidelor. Deoarece electroforeza și autoradiografia se realizează în același mod și în cazul metodei Sanger și colab. (1977), ele vor fi descrise în continuare.

Metoda Sanger și colab. (1977). În ultimul timp această metodă este preferată de cercetători pentru stabilirea secvenței nucleotidelor din ADN, mai ales datorită faptului că vectorii de clonare au ajuns atît de perfecționați, încît ei oferă atît posibilitatea clonării fragmentului de ADN, cît și aceea a secvențializării lui. Prin urmare, cele două operații deosebit de complexe pot fi acum cuplate, simplificînd foarte mult munca cercetătorului.

Etapele principale ale secvențializării unui ADN prin metoda Sanger și colab. (1977), utilizînd vectori de clonare genică, sînt prezentate schematic în fig. 5—10.

Fragmentul de ADN care urmează a fi secvențializat (în fig. 5—10 el este reprezentat prin secvența 3′-GGCTAAC-5′) se introduce întîi în vectorul de clonare genică, prin metodele specifice tehnologiei ADN recombinat. Apoi recombinatul (vectorul+fragmentul) este hibridizat cu un primer (o secvență specifică de nucleotide cu rol de „amorsă“). Primerul atașat la vector prin complementaritate servește ca inițiator al sintezei de ADN complementar fragmentului atașat. Sinteza ADN complementar este realizată de ADN polimeraza I (fragmentul Klenow), în prezența celor patru nucleozidtrifosfați, dintre care unul (dATP) este marcat cu ^{35}S. Pentru a stopa specific sinteza moleculelor de ADN complementare în dreptul celor patru baze, reacția de sinteză se face în prezența unor „terminatori“, reprezentați de didezoxiribonucleozidtrifosfați. De exemplu, dacă în amestecul de reacție de sinteză a ADN complementar, alături de cei patru nucleozidtrifosfați, se introduce didezoxiadenozintrifosfatul (ddATP), catenele nou-sintetizate se vor opri în dreptul adeninei, deoarece ddATP încorporat sub formă de ddAMP în molecula de ADN nu permite elongarea catenei. Precizăm că didezoxiderivații nucleotidelor, fiind lipsiți de gruparea 3′-OH, nu pot participa la formarea legăturii internucleotidice 3′—5′, motiv pentru care ei sînt utilizați pentru a opri specific elongarea moleculelor de ADN. În același fel, ddCTP, ddGTP și ddTTP, introduși separat în amestecul de reacție, vor opri sinteza în dreptul citozinei, guaninei, respectiv timidinei. Prin urmare, efectuîndu-se patru reacții de sinteză în prezența celor patru terminatori, se vor obține patru specii diferite de molecule, terminate la A, C, G și T. Apoi aceste molecule sînt analizate în gel de poliacrilamidă, iar autoradiografia gelului permite stabilirea exactă a secvenței. După cum se vede în fig. 5—10, fiecare bandă de pe autoradiografie reprezintă cîte un fragment de ADN complementar, iar mobilitatea lui este invers proporțională cu lungimea catenei respective.

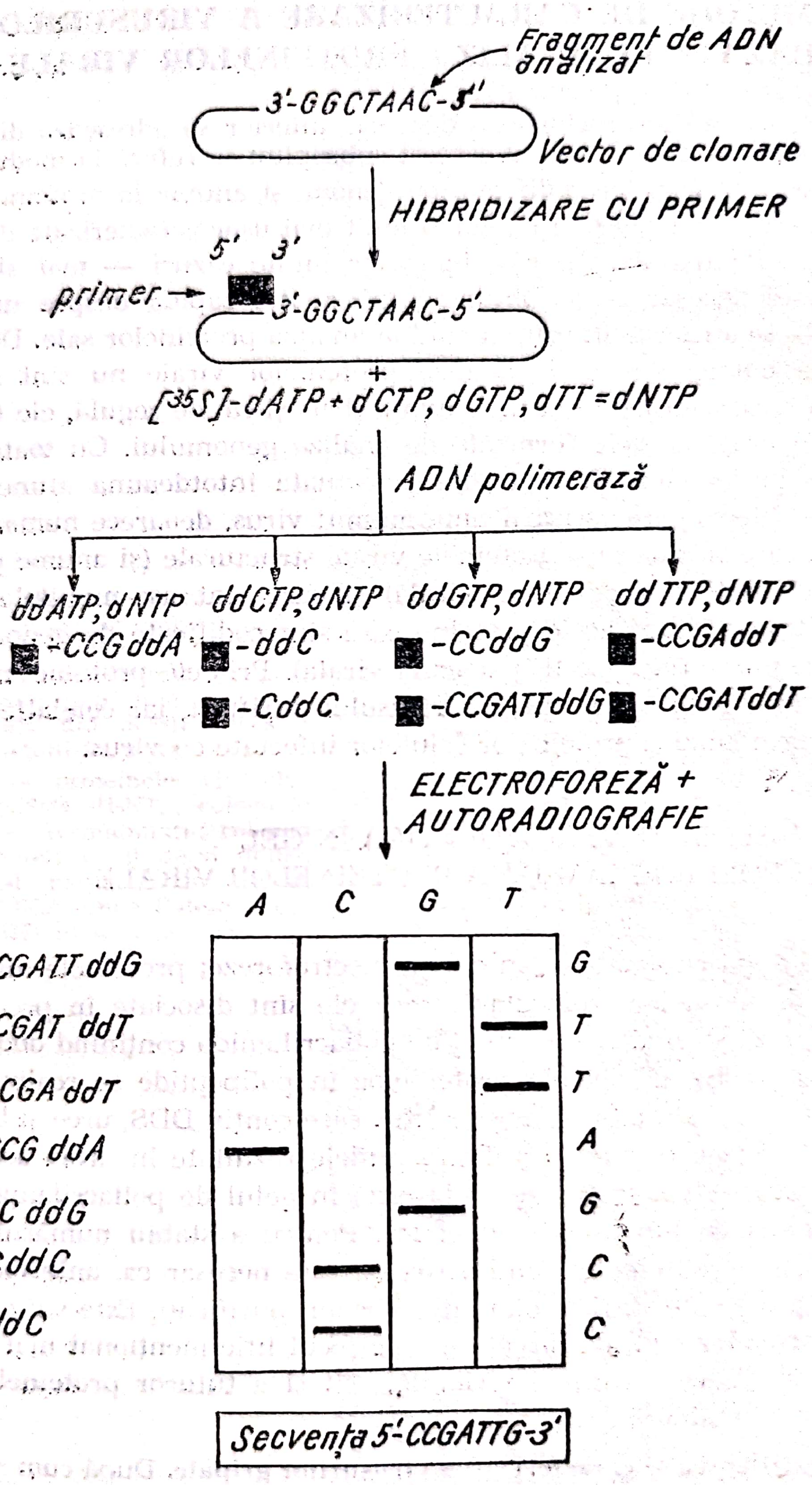

Fragment de ADN analizat
3'-GGCTAAC-5'
Vector de clonare
HIBRIDIZARE CU PRIMER
5' 3'
primer
3'-GGCTAAC-5'
+
[35S]-dATP + dCTP, dGTP, dTT = dNTP
ADN polimerază
ddATP, dNTP
ddCTP, dNTP
ddGTP, dNTP
ddTTP, dNTP
-CCGddA
-ddC
-CddC
-CCddG
-CCGATTddG
-CCGAddT
-CCGATddT
ELECTROFOREZĂ + AUTORADIOGRAFIE
A
C
G
T
- CCGATT ddG
- CCGAT ddT
- CCGA ddT
- CCG ddA
- CC ddG
- CddC
- ddC
G
T
T
A
G
C
C
Secvența 5'-CCGATTG-3'

Fig. 5-10 — Schema utilizării metodei Sanger și colab. (1977) pentru determinarea secvenței nucleotidelor dintr-un ADN (detalii în text).

5.4. METODE DE CARACTERIZARE A VIRUSURILOR BAZATE PE ANALIZA PROTEINELOR VIRALE

Metodele de caracterizare descrise anterior se adresează direct analizei genomului viral, cele din acest subcapitol se referă la modul de evidențiere a produselor codificate de genom, și anume la proteinele virale. În general, proteinele virale pot fi mult mai ușor caracterizate decît acizii nucleici. Pentru acest motiv, în foarte multe cazuri — mai ales atunci cînd este necesar să se obțină o informație rapidă despre un anumit virus — se apelează în primul rînd la analiza proteinelor sale. De precizat însă că datele oferite de analiza proteinelor virale nu sînt suficiente pentru a caracteriza exact un anumit virus și că, de regulă, ele trebuie să fie coroborate cu cele furnizate de analiza genomului. Cu toate acestea, analiza proteinelor virale trebuie efectuată întotdeauna atunci cînd se pune problema caracterizării unui anumit virus, deoarece numai ea poate preciza care sînt de fapt proteinele virale structurale (și anume proteinele care fac parte din particula virală) și care sînt așa-numitele proteine nestructurale (adică acele proteine care sînt codificate de genomul viral, dar care nu se regăsesc în particula virală). Primele proteine menționate se pun în evidență prin analiza virusului purificat, iar celelalte, nestructurale, prin analiza proteinelor celulelor infectate cu virus.

5.4.1. ANALIZA ELECTROFORETICĂ ÎN GEL DE POLIACRILAMIDĂ A PROTEINELOR VIRALE

Așa după cum se știe, în cursul electroforezei proteinele migrează în funcție de masa lor moleculară, dacă ele sînt disociate în prealabil, iar electroforeza se efectuează în gel de poliacrilamidă conținînd dodecilsulfat de sodiu (DDS). Disocierea proteinelor în polipeptide se realizează prin tratarea lor la cald cu un amestec litic, care conțin DDS, uree și beta-mercaptoetanol (sau ditiotreitol). Polipeptidele rezultate în urma acestui tratament, supuse electroforezei, migrează în gelul de poliacrilamidă invers proporțional cu lungimea catenei lor. Pentru a stabili numărul și masa moleculară a proteinelor unui virus nu este necesar ca, anterior electroforezei, proteinele să fie izolate din virionii purificați. Este suficientă tratarea particulelor virale direct cu amestecul litic menționat mai sus, care determină disocierea atît a virionilor, cît și a tuturor proteinelor virale pînă la polipeptide.

Identificarea și caracterizarea virusurilor gripale. După cum s-a arătat anterior, genomul ARN al virusurilor gripale este fragmentat, iar în cazul virusurilor gripale de tip A el este constituit din opt fragmente diferite.

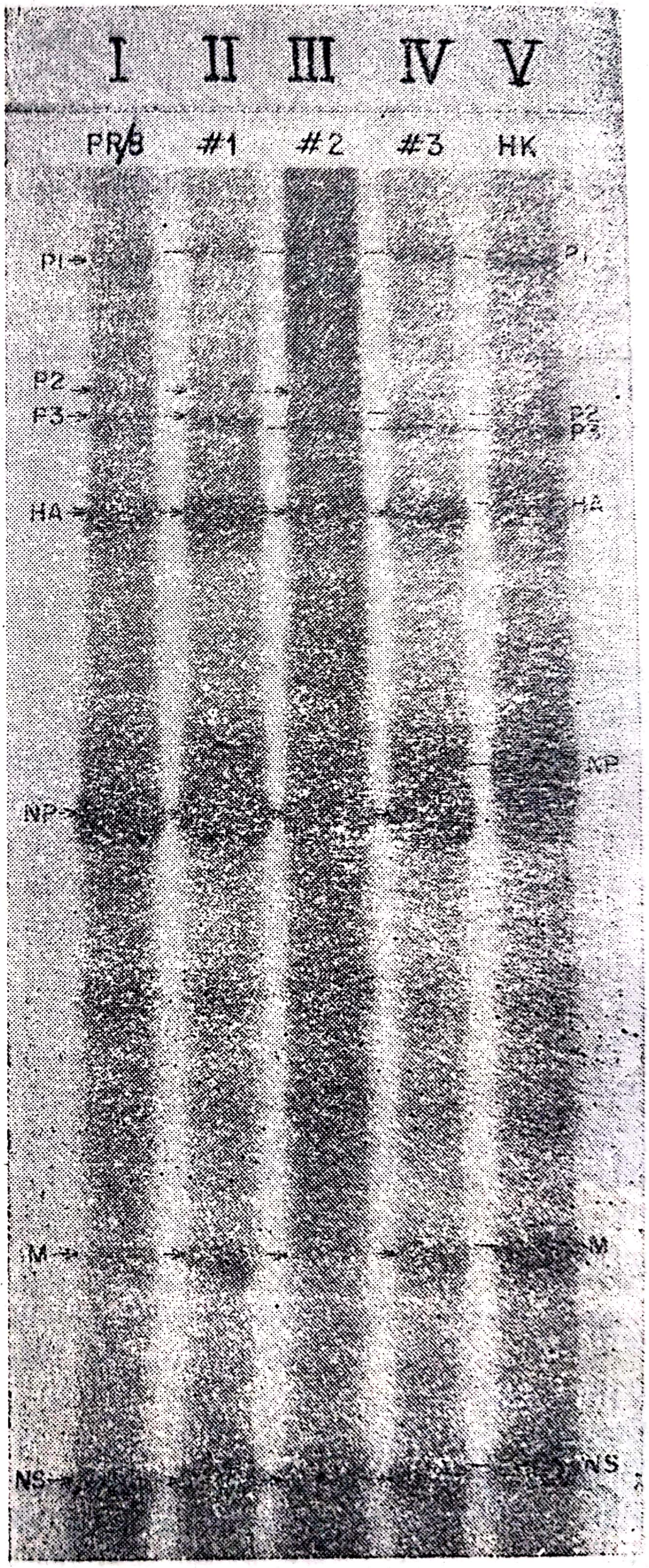


Fig. 5-11 — Analiza electroforetică în gradient de gel de poliacrilamidă (5—13%) a proteinelor a două tulpini parentale de virusuri gripale, tip A, precum și a unor recombinați derivați din aceste virusuri (detalii în text).

Coloana I — proteinele virusului gripal A/PR/8/34 (H_0N1) ; *coloanele II, III, IV* — recombinați ; *coloana V* — proteinele celui de-al doilea virus gripal parental de tip A (HK/8/68 (H3N2) (după Palese și colab., 1977) (detalii în text).

Fiecare fragment de ARN genomic reprezintă de fapt o genă, care — în celulele permisive infectate — controlează sinteza unei proteine virale corespunzătoare. Prin urmare, cele opt gene dirijează în celulele infectate cu un virus gripal de tip A sinteza a opt proteine virale diferite. Pentru a diferenţia proteinele virale de cele celulare, cele virale se marchează cu un izotop radioactiv, cum ar fi de exemplu ^{35}S. În acest scop, monostratul de celule infectate cu virusul gripal care urmează a fi analizat este incubat timp de 16 min cu o soluţie Earle, conţinînd ^{35}S-metionină. Marcarea cu ^{35}S se face după 6 ore de la momentul infectării celulelor cu virus. După marcare, celulele sînt recoltate, iar apoi o mică parte din ele este încălzită 2 min, la 100°C, într-o soluţie conţinînd DDS 2%, uree 8 M şi beta-mercaptoetanol 5%. Unii autori recomandă ca disocierea proteinelor să se facă doar cu DDS şi beta-mercaptoetanol, omiţîndu-se ureea din amestecul litic (Palese şi colab., 1977). În continuare, proteinele celulare şi virale astfel disociate sînt supuse electroforezei în gel de poliacrilamidă conţinînd DDS. În fig. 5—11 prezentăm rezultatele unei astfel de analize. Din examinarea imaginii, rezultă că prin analiza electroforetică a proteinelor se pot diferenţia atît deosebirile care există între două virusuri de tip A (virusul PR/8 şi virusul HK), cît şi caracteristicile recombinaţilor lor (*1, 2, 3*). Precizăm că *P1*, *P2* şi *P3* reprezintă proteinele polimerazice, *HA* — proteina hemaglutininei, *NP* — proteina nucleoproteinei, *M* — proteina-*matrix* şi *NS* — proteina nestructurală. În fig. 5—11 nu este precizată a opta proteină, cea corespunzătoare neuraminidazei, care este probabil reprezentată de banda existentă între *NP* şi *M*.

În fig. 5—12 prezentăm un alt exemplu de utilizare a analizei electroforetice a proteinelor virale, în care am pus în evidenţă diferenţele existente între un virus Sendai normal *(a)* şi un virus Sendai avînd proteina hemaglutininei şi neuraminidazei (HN) alterată *(b)* (Popa şi colab., 1985) ; virusul Sendai normal conţine cinci proteine principale, şi anume : proteina P, proteina HN, proteina nucleoproteinei NP, factorul de fuziune F, proteina-*matrix* M. Spre deosebire de acesta, virusul alterat conţine numai patru proteine principale (P, NP, F, M), fiind total lipsit de proteina HN.

În sfîrşit, mai prezentăm un exemplu simplu, întrucît nu implică utilizarea izotopilor radioactivi, de identificare a virusului Sendai în celulele infectate cu acest virus. Culturile celulare de fibroblaste de pui de găină, recoltate la 10, 18 şi 24 de ore după ce au fost inoculate cu virus, au fost analizate prin metoda electroforezei în gel de poliacrilamidă conţinînd DDS. Analiza relevă prezenţa proteinelor virale specifice în celulele infectate. Dintre acestea, cea mai vizibilă pe electroforegramă este proteina NP, pe de o parte deoarece este cea mai abundentă componentă proteică a virusului, iar pe de altă parte deoarece celulele nu conţin

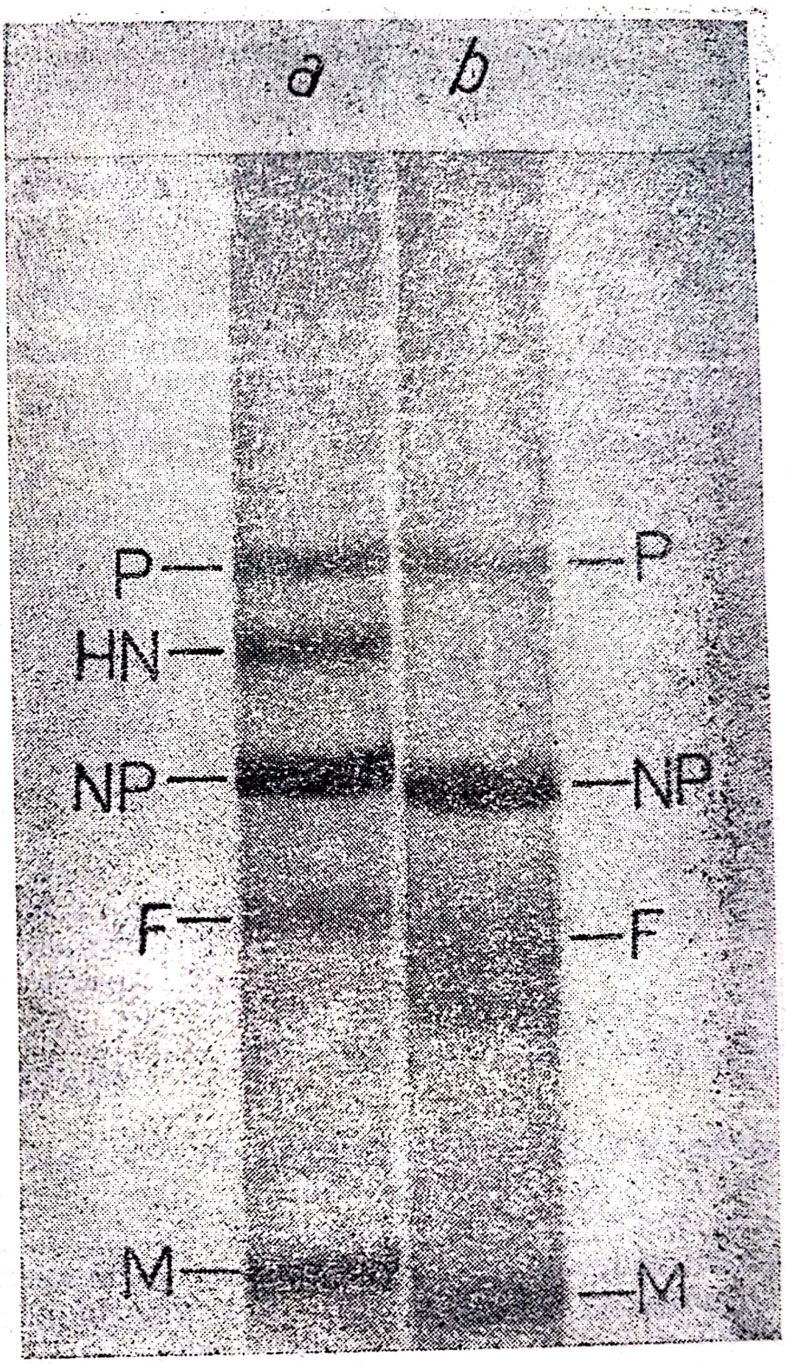


Fig. 5-12 — Proteinele specifice virusului paragripal 1 Sendai, puse în evidență prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă.

Coloana a — proteinele virionilor normali; *coloana b* — proteinele virionilor avînd proteina HN alterată (după Popa și colab., 1985).

o proteină care are mobilitatea electroforetică identică celei a proteinei NP (Repanovici și colab., 1980) (fig. 5—13). Metoda aceasta am utilizat-o și la identificarea unor virusuri gripale (Popa și colab., 1978).

Identificarea proteinelor virale (în absența izotopilor radioactivi), separate electroforetic, se face în ultima vreme prin colorație argentică, deoarece sensibilitatea acestei colorații este comparabilă cu aceea bazată pe utilizarea izotopilor radioactivi. Avantajele colorației argentice în cazul caracterizării unor virusuri paragripale le-am prezentat într-o altă lucrare (Anghel și colab., 1986).

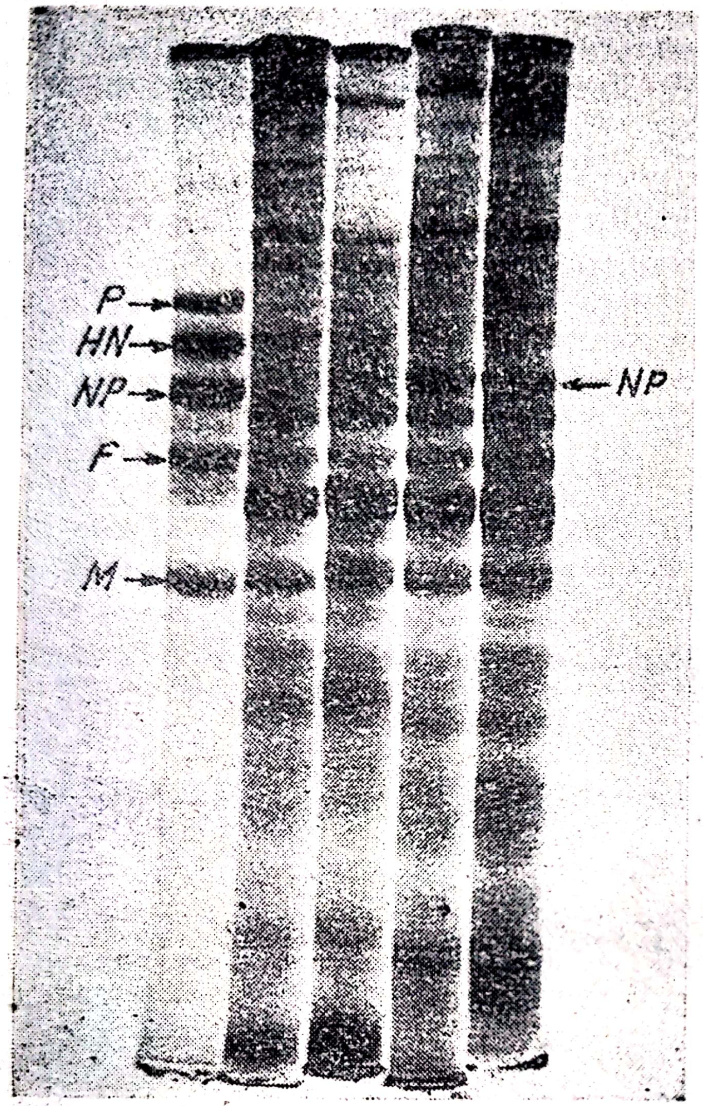
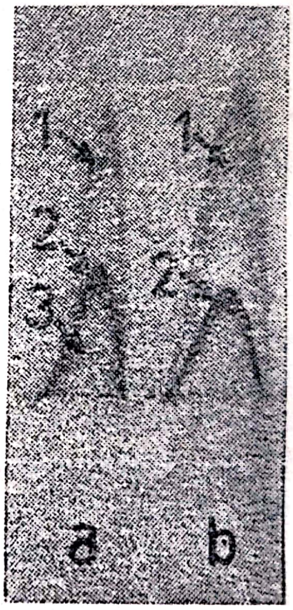


Fig. 5-13 — Evidenţierea proteinelor virusului Sendai în culturi celulare infectate (după Repanovici şi colab., 1980) (detalii în text).

Fig. 5-14 — „*Rocket*"-imunoelectroforeza glicoproteinelor virusului Sendai normal *(a)* şi a glicoproteinelor izolate din virusul Sendai avînd glicoproteina HN alterată *(b)* (după Popa şi colab. 1985).



5.4.2. ANALIZA ANTIGENICĂ

Analiza antigenică a proteinelor virale, în diferitele ei variante, este curent utilizată pentru identificarea şi caracterizarea virusurilor. Datele furnizate de această analiză sînt deosebit de utile atît studiilor de diagnostic, cît şi celor de epidemiologie.

Întrucît variantele analizei sînt numeroase, unele dintre ele fiind prezentate în diferite capitole ale acestui tratat, ne vom referi în continuare numai la determinarea antigenelor de suprafaţă ale virusului Sendai prin analiza imunoelectroforetică (fig. 5—14). Virusul Sendai are două componente antigenice de suprafaţă, proteinele HN şi F, ambele de natură glicoproteică. Proteina HN este responsabilă de activităţile hemaglutinantă şi neuraminidazică, iar proteina F — de activitatea de hemoliză şi fuziune indusă de virus. Aceste glicoproteine pot fi puse în evidenţă prin „*rocket*"-imunoelectroforeză, cu ajutorul anticorpilor specifici prezenţi în serul cobailor imunizaţi fie cu virus Sendai întreg (Popa şi colab., 1978), fie cu glicoproteinele izolate de pe suprafaţa virusului Sendai

(Popa și colab., 1985). Identificarea celor două componente de suprafață a fost facilitată de utilizarea unor virioni de Sendai, care — așa cum am arătat deja în fig. 5—13 — nu conțin componenta HN.

5.4.3. FOCUSAREA IZOELECTRICĂ

În această analiză, proteinele virale sînt separate în funcție de sarcina lor electrică. Analiza se efectuează cu un aparat special de „electrofocusare“, care permite obținerea unui gradient de pH și a unui cîmp electric. Gradientul de pH se realizează cu ajutorul amfoliților, substanțe care au proprietatea ca în cîmpul electric să se distribuie rapid în concordanță cu sarcinile lor electrice, iar cîmpul electric este obținut la fel ca și în cazul electroforezei obișnuite.

Proteinele virale care urmează a fi analizate sînt introduse în aparat, simultan cu amfoliții. Aplicînd apoi asupra amestecului un cîmp electric, se va determina migrarea amfoliților și a proteinelor spre cei doi poli electrici : amfoliții și proteinele cu sarcină negativă clară vor migra spre polul pozitiv, în timp ce amfoliții și proteinele cu sarcină pozitivă vor migra spre polul negativ. Avînd dimensiuni mai mici decît proteinele, amfoliții migrează mult mai repede în cîmpul electric decît proteinele și, în consecință, distribuția lor rapidă asigură formarea gradientului de pH, necesar separării proteinelor. În timpul migrării însă, sarcina netă a proteinelor este în mod continuu redusă, iar în momentul în care moleculele ajung în zonele de pH (create de amfoliți) corespunzătoare punctului lor izoelectric, sarcina lor electrică devine nulă, iar ele se concentrează (sînt focusate). În acest fel se face concentrarea proteinelor în zonele de pH corespunzătoare punctelor lor izoelectrice.

5.4.4. HARTA POLIPEPTIDELOR

Pentru a caracteriza mai exact decît se poate face prin analizele anterioare un anumit virus sau o anumită proteină virală, din punct de vedere al componentelor lor proteice, se recurge la stabilirea hărții peptidice. Întrucît numărul peptidelor care ar rezulta în urma hidrolizei proteolitice a unui virus ar fi extrem de mare, analiza se efectuează separat, numai asupra unei singure componente proteice.

În linii mari, această analiză se aseamănă cu aceea descrisă în subcapitolul 5.2.2. din prezentul capitol, referitor la modul de stabilire a hărții oligonucleotidelor. De această dată, proteina este hidrolizată cu o protează specifică (tripsină, pepsină etc.), iar peptidele rezultate — separate prin diferite metode — sînt comparate cu cele rezultate în urma hidrolizei unor proteine virale de referință.

Analiza are o deosebită valoare atît pentru caracterizarea unor virusuri, cît și pentru stabilirea naturii unor variațiuni antigenice ale unor tulpini virale. Ea poate fi efectuată în diverse variante, dar în continuare vom descrie numai una dintre acestea, relativ ușor de realizat. Exemplul se referă la stabilirea hărții peptidice a proteinelor specifice virusului Sendai. Mai întîi, proteinele virale sînt separate electroforetic, în modul descris în subcapitolul 5.4.1. Apoi, fiecare proteină virală este extrasă din gelul de poliacrilamidă și hidrolizată parțial cu chimotripsină. Polipeptidele rezultate sînt analizate electroforetic în gel de poliacrilamidă 13%.

În fig. 5—15 se prezintă rezultatul unei astfel de analize. Cu ajutorul ei s-a stabilit, pe de o parte, că proteinele L, P, HN, NP și M sînt proteine virale unice, harta lor peptidică fiind total diferită, iar, pe de altă parte, că proteina F_0 derivă din proteina F1, întrucît ele au foarte multe peptide comune (Lamb și Chopin, 1978).

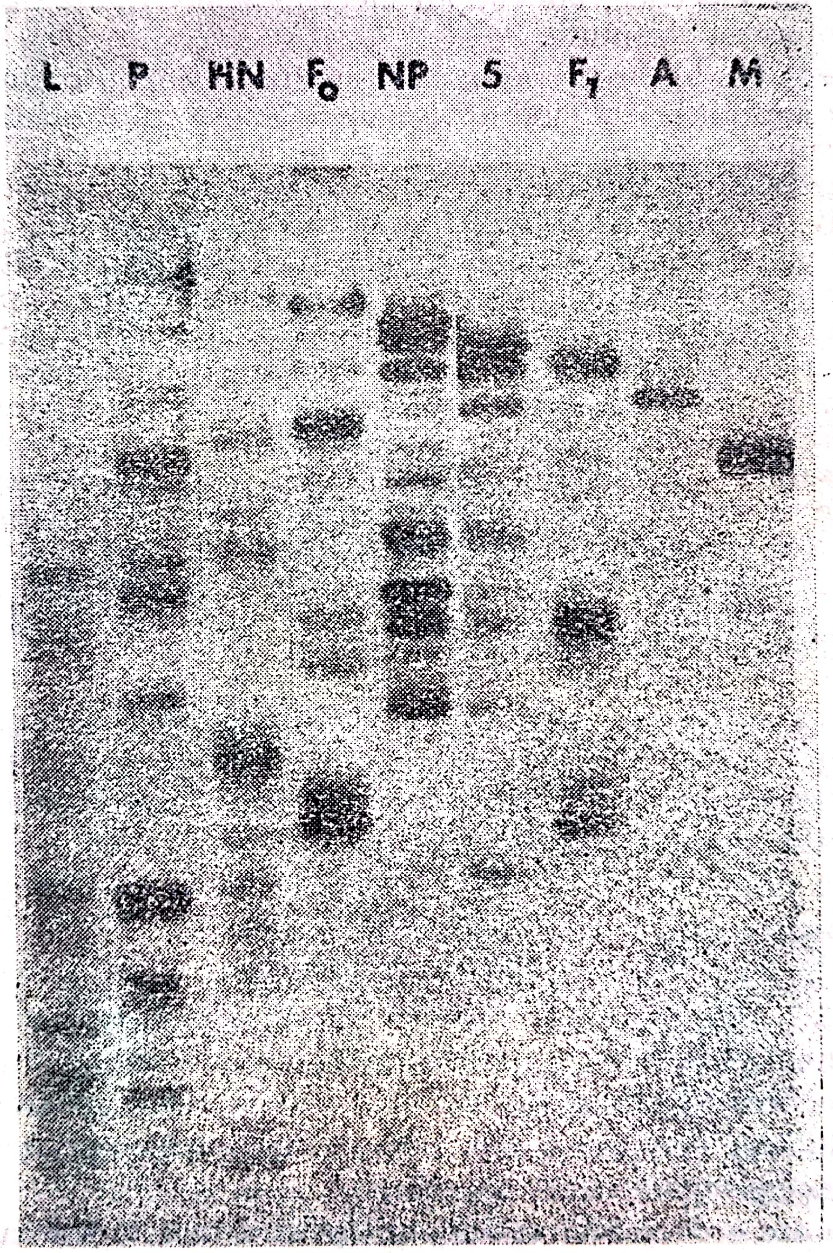


Fig. 5-15 — Harta polipeptidelor proteinelor virusului Sendai hidrolizate parțial cu chimotripsină. Electroforeza peptidelor s-a făcut în gel de poliacrilamidă 13% (după Lamb și Choppin, 1978).

5.4.5. ANALIZA SECVENȚELOR DE AMINOACIZI

Aceasta este cea mai completă analiză care poate fi realizată asupra unei proteine virale. Rezultatele ei permit stabilirea structurii primare, adică a ordinii exacte în care sînt înlănțuiți aminoacizii în interiorul catenei polipeptidice a proteinei. Determinarea poate fi făcută direct asupra proteinei virale, utilizînd un aparat automat (analizor de aminoacizi), care permite realizarea rapidă a analizei. Analizorul de aminoacizi este însă un aparat scump, motiv pentru care această analiză nu este de rutină, ea efectuîndu-se numai în laboratoare foarte bine utilate.

Dar structura primară a unei proteine virale poate fi dedusă și indirect, din secvența bazelor genei care o codifică. În acest caz, gena se clonează în bacteria *E. coli*, iar secvențele bazelor sale se determină prin unul din procedeele menționate în subcapitolul 5.3.4.

Nici această variantă nu este ușor de realizat, totuși ea este considerată a fi mai accesibilă diferitelor laboratoare, cele mai multe determinări de secvențe de aminoacizi realizîndu-se pe această cale.

Bibliografie selectivă

ANGHEL C., ILIESCU R., REPANOVICI R. și colab. — Rev. Roum. Med., Virol., 1986, 37, 237—245.
GALIBERT F., MANDART E. FITOUSSI F. și colab. — Nature, 1979, 281, 646—649.
LAVER W. G., WEBSTER R. G. — Virology, 1973, 51, 383—389.
MAXAM A., GILBERT W. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 560—564.
PEATTIE D. A. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 76, 1 760—1 764.
POPA L., REPANOVICI R., SAMUEL I. — Acta Virol., 1978, 22, 433—442.
POPA L., REPANOVICI R., ILIESCU R. și colab. — Acta Virol., 1985, 29, 461—465.
REPANOVICI R., MIHALACHE O., ILIESCU R. și colab. — Rev. roum. Méd., Virol., 1980, 31, 213—219.
RITCHEY M. B., PALESE P., SHULMAN J. L. — J. Virol., 1976, 20, 307—315.
SIMONCSITS A., BROWNLEE G. G., BROWN R. S. și colab. — Nature, 1977, 269, 833—836.
SOUTHERN E. M. — J. Mol. Biol., 1975, 98, 503—517.
TIOLLAIS P., DEJEAN A. — Recherche, 1985, 171, 1 324—1 333.

Replicarea virusurilor

Toate evenimentele dinamice asociate virusurilor — paraziți celulari absoluți — au loc exclusiv în celulele-gazdă, care pun la dispoziția agresorilor atît „cărămizile“ necesare construcției particulelor virale-fiice (aminoacizi, nucleotide, glucide, lipide etc.), cît și întregul aparat de sinteză (ribozomii — sediul proteosintezei, enzimele, sistemele energetice etc.).

Odată pătruns în celulă, virusul înlocuiește informația proprie celulei cu informația sa specifică, „deturnînd“ funcțiile celulare exclusiv sau aproape exclusiv spre sinteza componentelor virale, alternînd total metabolismul celular. Majoritatea elementelor necesare biosintezei componentelor virale sînt furnizate de către celula invadată, dar cel mai adesea virusul aduce și propria sa contribuție, exprimată fie prin unele enzime structurale virale (existente ca atare în particula virală), fie prin determinarea sintezei în fazele timpurii ale infecției virale a unor proteine virale specifice.

Gradul de dependență a replicării virusurilor de componentele celulare este corelat cu capacitatea genomului viral de a codifica proteinele esențiale pentru ciclul de replicare propriu. Astfel, dintre virusuri, cel mai mare genom îl au *poxvirusurile,* cu o capacitate de codificare de 150—200 de proteine, printre care numeroase au activitate enzimatică. Deci, din punct de vedere al replicării, poxivirusurile sînt mai puțin dependente de enzimele celulare comparativ cu membrii altor familii de virusuri animale. Pe de altă parte, *parvovirusurile* au un genom care codifică doar cîteva proteine, iar replicarea lor depinde integral de enzimele celulare. Între aceste două extreme se află celelalte familii de virusuri, care depind în grad variabil de funcțiile celulare.

6.1. PRINCIPALELE FAZE ȘI ETAPE ALE REPLICĂRII VIRALE

Studiul replicării virusurilor animale a fost influențat în mare măsură de cercetările efectuate pe bacteriofagi, de unde s-a preluat și conceptul de „ciclu unic de creștere“ („*one-step growth*“ *experiment*). În esență, acest „ciclu unic de creștere“ — așa cum este el utilizat în virusologia animală — constă în infectarea simultană a unei populații de celule cu cel puțin o particulă virală *per* celulă (de obicei 10—100 de particule *per* celulă), pentru a fi siguri că celulele au fost infectate în totalitate și că între evenimentele care vor avea loc ulterior în celule există un grad înalt de sincronizare. După inactivarea particulelor virale rămase în afara celulei, culturile celulare astfel infectate sînt testate la diverse intervale pentru determinarea numărului particulelor infectante formate atît în celulele infectate, cît și a numărului particulelor eliberate în mediu.

Așa cum s-a arătat anterior, în capitolul „Clasificarea virusurilor“, virusurile animale — inclusiv cele umane — au fost clasificate în diferite familii, pe baza unor caracteristici unice ale lor, printre care și mecanismele lor de replicare. Dar, pe baza datelor obținute în urma studiilor efectuate cu diferite virusuri s-a ajuns la concluzia existenței unei scheme generale de replicare virală, independentă de tipul de virus luat în discuție. Prin *ciclu de replicare* virală se denumește intervalul de timp cuprins între pătrunderea virionilor în celula-gazdă și punerea în evidență a particulelor virale progene. Fazele fundamentale ale ciclului de replicare virală sînt prezentate în fig. 6-1. Se deosebesc astfel :

— *perioada de eclipsă* : după pătrunderea în celulă, virionii infectanți (sau acidul lor nucleic) dispar și nu mai pot fi puși în evidență în interiorul gazdei timp de cîteva ore, pînă la apariția progenilor ;

— *perioada latentă* : se referă la intervalul de timp scurs între dispariția virionilor inoculați și eliberarea progenilor în mediul extracelular. În cazul virusurilor animale, eliberarea se poate face treptat, pe un interval de timp variabil, sau majoritatea virionilor rămîn asociați celulei pe toată durata ciclului de replicare virală. Celulele animale nu „explodează“ ca bacteriile, ci se poate observa, în unele cazuri, forma-

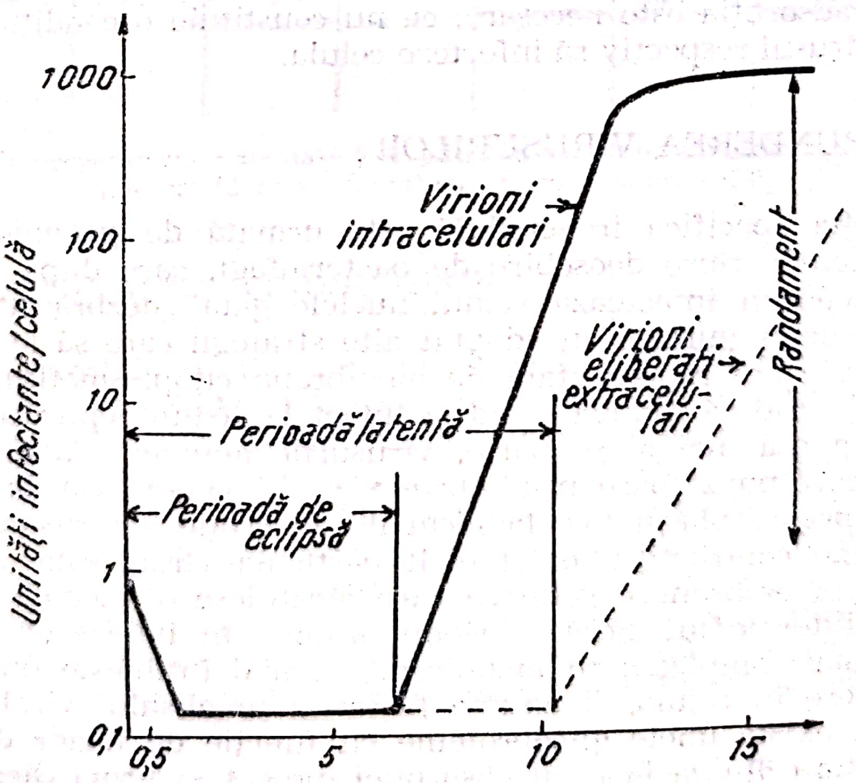


Fig. 6-1 — Schema generală de replicare a unui virus animal, eliberat din celulă tîrziu și parțial ; uneori curbele de infectivitate intra- și extracelulară pentru virioni corespund (după Fenner și colab., 1974).

rea unei mase de resturi celulare care înglobează cea mai mare parte a progenilor rezultați. De aceea în diagrama prezentată (vezi fig. 6-1) curba infectivității virionilor intracelulari nu se suprapune curbei infectivității virionilor extracelulari.

În aceste condiții apare și noțiunea de *randament viral*, care reprezintă numărul de particule virale sau, mai bine-zis, de unități infectante produse de către o celulă.

Ciclul de replicare virală poate fi disecat în cîteva etape cu desfășurarea secvențială, cu toate că trecerea de la o etapă la alta se face treptat, iar după primele cîteva ore de la infecție, unele etape ajung să se petreacă simultan, deși sînt diferite între ele.

6.1.1. ADSORBȚIA VIRUSURILOR

În general, pentru ca replicarea virală să aibă loc, particulele virale — indiferent de natura genomului lor, ADN sau ARN — trebuie să se atașeze pe suprafața celulei-gazdă în vederea înglobării lor intracelulare. *Adsorbția* virionilor la membrana plasmatică are loc după ce, în urma mișcării browniene, virionii ciocnesc celula, fixîndu-se de membrană reversibil, prin intermediul forțelor electrostatice. Urmează *adsorbția specifică ireversibilă,* care implică afinitatea anumitor structuri virale pentru anumite porțiuni ale membranei celulare, numite *receptori virali*. Absența receptorilor specifici de pe suprafața unor celule explică de ce unele celule sînt nepermisive pentru anumite virusuri. De altfel, deși adsorbția este necesară, ea nu constituie o condiție suficientă pentru ca virusul respectiv să infecteze celula.

6.1.2. PĂTRUNDEREA VIRUSURILOR

Adsorbția specifică ireversibilă este urmată de *pătrunderea* virusurilor în celule. Spre deosebire de bacteriofagi, care după atașarea la peretele bacterian injectează acidul nucleic gata „dezbrăcat" direct în celulă, virusurile animale au adoptat alte strategii care să le permită să depășească bariera reprezentată de membrana citoplasmatică, astfel încît genomul viral să ajungă rapid și intact la sediul replicării virusului respectiv. În cea mai mare parte, virusurile animale pătrund în celulele-gazdă corespunzătoare prin *viropexie*. Fenomenul constă în invaginarea membranei plasmatice la locul de adsorbție a virusului, datorită unor proteine contractile, astfel încît particula virală este „îmbrăcată" de structuri membranare celulare care alcătuiesc o vacuolă de endocitoză, prin intermediul căreia virionul ajunge în interiorul celulei. La virusurile mai complexe, cu membrană, se mai întîlnește un mecanism de pătrundere în celulă, și anume *fuziunea* învelișului viral (în structura căruia există unele glicoproteine cu funcție de factor de fuziune) cu membrana celulară la locul absorbției, proces în urma căruia componentele virale pătrund în celulă. Fig. 6-2 ilustrează modul în care penetrează în celulă diferitele clase de virusuri, prezentînd unele particularități individuale ale procesului respectiv.

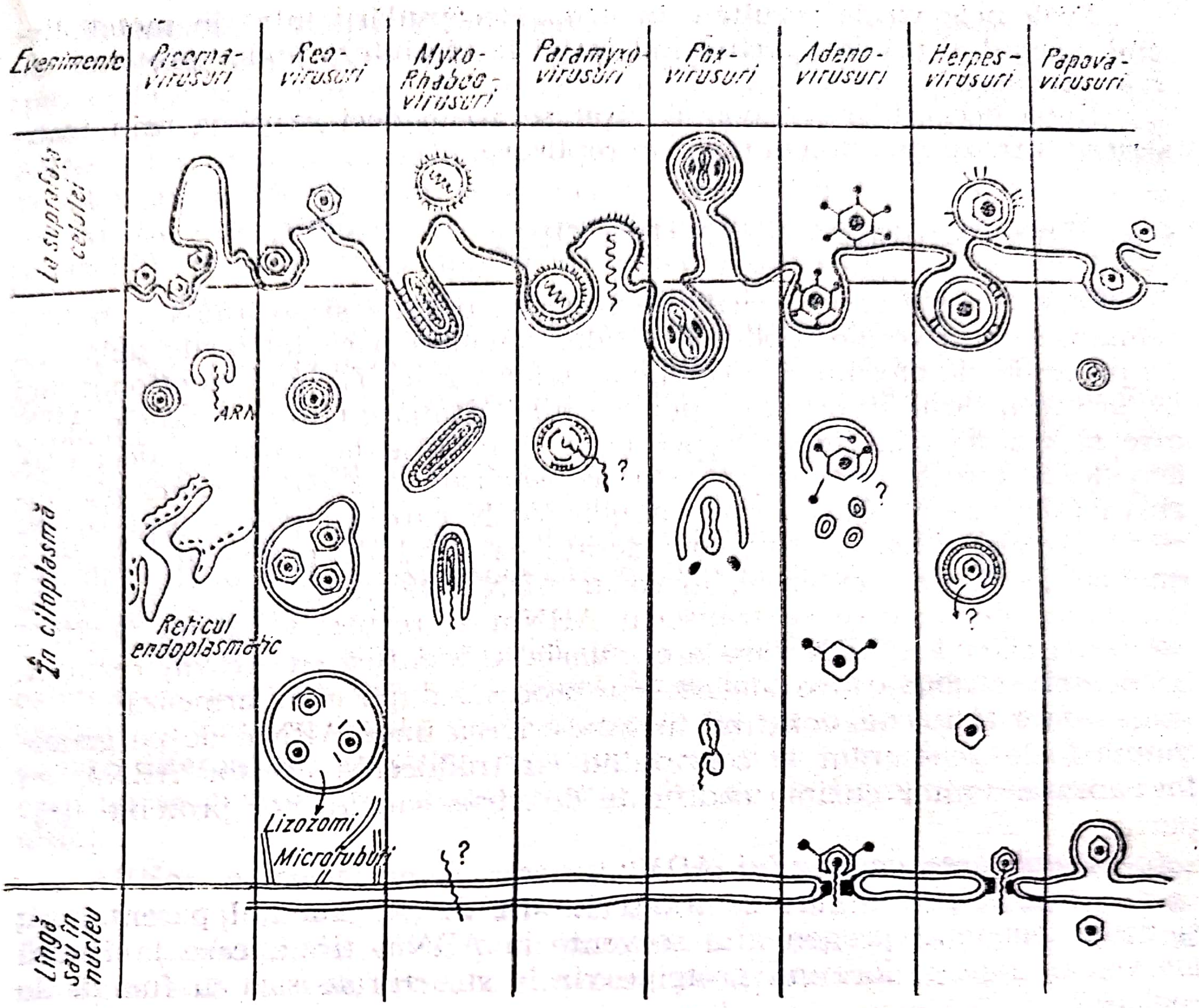

Evenimente
Picorna-virusuri
Reo-virusuri
Myxo-Rhabdo-virusuri
Paramyxo-virusuri
Pox-virusuri
Adeno-virusuri
Herpes-virusuri
Papova-virusuri
La suprafața celulei
În citoplasmă
Lîngă sau în nucleu
ARN
Reticul endoplasmatic
Lizozomi
Microtubuli
?

Fig. 6-2 — Reprezentarea schematică a pătrunderii unor virusuri animale în celulele-gazdă corespunzătoare (după Dales, 1973).

6.1.3. DECAPSIDAREA VIRUSURILOR

Odată ajunși în celulă, virionii eliberează acidul lor nucleic la un anumit sediu celular. Acest proces, de debarasare a genomului (a acidului nucleic infectant) de structurile care îl înconjură în particula virală matură, se numește *decapsidare*. Și în acest caz există diverse situații, cum ar fi eliberarea acidului nucleic la nivelul membranei citoplasmatice (cazul enterovirusurilor) sau decapsidarea atît de complexă a poxvirusurilor. Pe de altă parte, reovirusurile nici nu ajung vreodată la o decapsidare completă, enzima de transcriere asociată virionului funcționînd exclusiv în interiorul miezului virusului, păstrat într-o stare mai mult sau mai puțin intactă. Acizii nucleici virali au în continuare un rol dublu, și anume :

— acționează direct ca mesager sau servesc drept matriță pentru sinteza mesagerilor care, ulterior, vor fi traduși la proteinele virale ;

— orientează sinteza acizilor nucleici virali progeni, deci servesc ca matrițe de replicare a genomului viral.

Proteinele virale rezultate în urma decapsidării intră în metabolismul general al celulei, participînd astfel la biosinteza noilor proteine virale progene.

După decapsidare, genomul viral se poate deci exprima prin transcriere și traducere, precum și prin replicare.

6.1.4. TRANSCRIEREA ȘI TRADUCEREA

Imediat după ce virusurile au fost decapsidate și au ajuns la sediile celulare respective ale replicării virale, genomul parental poate deja iniția procesele de biosinteză a componentelor virale. Trebuie menționat aici că, prin convenție în urma propunerii lui Baltimore (1971), catenele ARN care se pot lega la ribozomi pentru a fi traduse la proteine, deci care acționează direct ca mesageri, sînt considerate a avea o polaritate pozitivă (plus, „+“). Ca revers, catenele ARN care nu pot fi traduse direct de către ribozomi sînt considerate ca fiind de polaritate negativă (minus, „—“). Prin extensie, în cazul ADN este notată ca lanț negativ catena de pe care se transcriu ARNm și respectiv catena pozitivă este acea catenă a ADN care are polaritate identică cu ARNm rezultat. Se deosebesc cîteva faze ale acestor procese, după cum urmează :

— *faza timpurie,* constînd în transcrierea unor ARNm de pe genele timpurii ale genomului și continuînd cu traducerea acestor ARNm cu formarea anumitor enzime codificate de virus sau a altor proteine timpurii ;

— *replicarea genomului ADN ;*

— *faza tîrzie,* în care se transcriu atît de pe genomul parental, cît și de pe genomul progen alte secvențe la ARNm tîrzii, care la rîndul lor vor fi traduși, formînd proteine virale structurale sau cu funcții de reglare.

Genele timpurii pot fi definite ca fiind acele secvențe de genom parental care se transcriu anterior replicării genomului viral, nefiind inhibate nici direct, de prezența citozinarabinozidei sau a fluorodezoxiuridinei, nici indirect, de către cicloheximidă, droguri care blochează în general sinteza ADN viral. De obicei, transcripții timpurii reprezintă o minoritate a genelor virale și codifică, în special, enzime timpurii, precum și alte proteine, de exemplu antigenele T sau unele proteine de legare a ADN (*DNA-Binding Protein,* DBP) etc. În cazul poxvirusurilor, speciile de ARNm timpurii se subîmpart, la rîndul lor, în alte două clase, și anume : imediat-timpurii (se pot sintetiza în prezența cicloheximidei, care inhibă sinteza unei proteine ce participă la ultima parte a decapsidării miezului viral, unde este localizată transcriptaza) și timpurii-decalate. Pentru transcrierea acestor gene, majoritatea virusurilor cu ADN care se multiplică în nucleu apelează la ARN polimeraza ADN-dependentă celulară, în timp ce poxvirusurile utilizează propria lor transcriptază (enzimă de transcriere).

Genele tîrzii sînt acele gene a căror rată de transcriere devine semnificativă abia după ce genomul a început să se replice. ARNm tîrzii conțin, în general, mesajul pentru sinteza proteinelor virale structurale, deși nu se poate face o delimitare foarte strictă între aceste două categorii de gene.

Transcripţii, timpurii sau tîrzii, corespund deseori unor molecule policistronice mari, care ulterior sînt supuse unui proces de prelucrare (*processing*) şi maturare, cu apariţia unor mesageri monocistronici. La capătul 3′ al aproape tuturor ARNm ai virusurilor animale, analogi ARNm din celulele eucariote, are loc procesul de poliadenilare (adică de adăugare a 100—150 de reziduuri de adenină), iar capătul 5′ al acestor ARNm este prelucrat în vederea formării structurii 5′-cap-m^{7}G (5′)ppp(5′)XY (caracteristica acestei structuri o constituie guanozina metilată în poziţia 7, legătura 5′,5′ între guanozină şi penultimul nucleotid, precum şi ciclurile de riboză metilată ale nucleotidelor X şi Y), specifică ARNm din celulele eucariote. În plus, lungimea transcriptului primar este de multe ori scurtată prin îndepărtarea unuia sau mai multor segmente interne de ARN fără valoare de codificare (*introni*). Fragmentele de ARN rămase şi conservate (*exoni*) se leagă prin procesul de *splicing* (cf. engl. *to splice* = a înnădi, a înnoda, a lega cap la cap), formînd ARN matur. Abia după această maturare şi prelucrare, moleculele de ARNm sînt transportate din nucleu la citoplasmă, în care se va desfăşura traducerea lor.

Nu toţi ARNm sînt transcrişi de pe aceeaşi catenă a ADN viral bicatenar. Se pare că, din acest punct de vedere, între speciile de ARNm timpurii şi tîrzii ar exista unele diferenţe şi probabil că această transcriere diferenţiată ar putea reprezenta un mecanism de control despre care nu se cunosc prea multe şi mai ales de ce funcţionează aşa şi nu altfel.

ARNm monocistronici, apăruţi în urma prelucrării transcripţilor primari sau prin transcriere directă, ajung în citoplasmă, unde sînt traduşi la proteine de către poliribozomi. În cazul virusurilor ADN nu există dovezi că s-ar produce o rupere posttranscripţională a unor polipeptide-gigant (ceea ce se petrece în cazul unor virusuri ARN), deşi unele ruperi hidrolitice s-au pus în evidenţă şi la formarea unora din proteinele virale structurale, jucînd un rol important în asamblarea finală a virusurilor.

Proteinele timpurii, sintetizate în prezenţa unor inhibitori ai replicării ADN, includ în special unele din numeroasele enzime şi proteine implicate în replicarea ADN, dar există virusuri — cum ar fi cele Papova — care se folosesc în replicarea ADN viral de o serie de enzime celulare, pe care le derepresează infecţia virală.

La majoritatea virusurilor ADN, în miezul viral s-au detectat proteine bogate în arginină, analoage histonelor. În carenţa de arginină, asamblarea miezurilor virale progene respective este inhibată.

6.1.5. REPLICAREA ADN VIRAL

Imediat ce concentraţiile enzimelor implicate în replicare au atins o anumită limită, începe replicarea ADN viral, pe baza principiului Watson-Crick al complementarităţii bazelor. În acest proces sînt implicate atît ADN polimeraze codificate de către virusurile respective (prezente sau nu de la bun început în miezul viral), cît şi unele enzime celulare specifice corespunzătoare. În cursul acestei etape de replicare, la ADN rămîn atașate unele proteine bogate în arginină.

Replicarea ADN circular al papovavirusurilor ridică unele probleme speciale, legate de supraîncolăcirea genomului lor. Pentru depășirea anumitor împiedicări de natură fizică, virusurile respective induc o endonuclează care introduce pe una din cele două catene o crestătură, timp în care este replicată o regiune scurtă a ADN, după care intervine o ligază cu rol de reparare a crestăturii anterioare, procesul desfășurîndu-se astfel din aproape în aproape.

6.1.6. MORFOGENEZA ȘI ELIBERAREA VIRUSURILOR

Pe măsură ce în celulă se formează noile genomuri, precum și polipeptidele virale structurale, are loc și procesul de *asamblare, maturare* sau *morfogeneză* a virionilor progeni. La virusurile mici s-ar părea că organizarea polipeptidelor și acizilor nucleici respectivi s-ar face în mod spontan, prin autoasamblare, pe baza existenței unor conformații specifice ale constituenților. La virusurile cu structură complexă, procesul de asamblare este și el mai complicat, implicînd și preluarea unor structuri celulare membranare, modificate prin inserarea unor glicoproteine virale specifice.

Eliberarea particulelor virale progene din celule se realizează prin diferite mecanisme, care sînt condiționate de particularitățile diverselor virusuri. Astfel, virusurile care conțin ARN sînt eliberate masiv din celulă, în timp ce virusurile care conțin ADN — cu excepția herpesvirusurilor — au tendința de a rămîne în celulele în care s-au replicat un timp îndelungat, eventual sub forma unor incluzii virale cristaline. Virusurile cu ARN sînt eliberate prin exocitoză prin „înmugurire“, după cum s-a constatat în cazul myxovirusurilor, paramyxovirusurilor și togavirusurilor ; virusurile cu ADN, de exemplu herpesvirusurile și unele poxvirusuri, sînt transportate spre suprafața celulei de către niște formațiuni denumite „cisterne“ (provenind din reticulul endoplasmatic), care apoi sînt învelite de fragmente ale membranei celulare interne. Fenomenul de înmugurire nu dăunează celulei-gazdă, deoarece membrana celulară se reface la locul de eliberare a virusului.

Virionii progeni eliberați în mediul extracelular se propagă apoi la celulele vecine, continuînd infecția.

Deși în linii mari replicarea virusurilor ARN urmează aceleași etape ca și replicarea virusurilor ADN, între cele două mari categorii de virusuri apar diferențieri fundamentale, care vor fi menționate anterior descrierii mecanismelor de replicare a diferitelor clase de virusuri ARN.

6.1.7. CLASE DE SISTEME GENETICE VIRALE

În funcție de modul de formare a ARNm viral, precum și de alte caracteristici ale replicării virionilor, Baltimore (1971) a propus șase clase de sisteme genetice virale, prezentate în continuare :

- *Clasa I* include virusuri al căror genom este reprezentat de ADN dublu-catenar, deci un sistem genetic analog celulei-gazdă ; în aceste virusuri, formarea ARNm se realizează prin transcriere asimetrică, adică a unei singure catene de ADN din genom. Din această clasă fac parte adenovirusurile, papovavirusurile, herpesvirusurile, poxvirusurile (care parazitează celulele animale), precum și unii bacteriofagi din seria T.

- *Clasa a II-a* cuprinde virusuri mici, al căror genom este reprezentat de ADN monocatenar, cu polaritate pozitivă, deci identică cu cea a ARNm corespunzători. Pentru sinteza ARNm este necesară în primul rînd sinteza antigenomului, adică a ADN complementar, cu catenă de polaritate negativă, care prin transcriere dă naștere la ARNm. Din această clasă se menționează parvovirusurile, unii bacteriofagi (Φ X174, G4 etc.).

- *Clasa a III-a* este formată din virusuri cu genom alcătuit dintr-un ARN bicatenar segmentat. În cazul lor, ca și la virusurile cu ADN bicatenar, se înregistrează o transcriere asimetrică, adică pentru formarea ARNm se copiază o singură catenă a genomului, considerată, prin convenție, negativă. Această clasă include mycovirusurile sau mycofagii (ca cei care infectează *Aspergillus, Penicillium* și numeroși alți fungi), virusuri ale plantelor, precum și virusuri animale cu genom segmentat, cum ar fi reovirusurile și birnavirusurile.

- *Clasa a IV-a* include virusuri cu genom ARN monocatenar, continuu sau segmentat, care are aceeași secvență de nucleotide ca și ARNm corespunzători. ARN izolați din aceste virusuri au un caracter infectant, adică pot reproduce infecția virală. În această clasă de virusuri cu genom ARN pozitiv, sînt incluse picornavirusurile și togavirusurile animale, fagii ARN (MS2, μ etc.), precum și numeroase virusuri ale plantelor.

- *Clasa a V-a* este formată din virusuri avînd ca genom tot molecule de ARN monocatenar, continue sau segmentate, dar acestea nu au caracter infectant, adică după deproteinizare nu pot reproduce infecția virală, neputînd funcționa ca ARNm. Prin convenție, aceste virusuri sînt considerate a avea genom ARN negativ și dintre ele fac parte myxo- și paramyxovirusurile, rhabdovirusurile și alte virusuri animale.

- *Clasa a VI-a* cuprinde virusuri al căror genom este format de ARN monocatenar, cu polaritate identică celei a ARNm, dar care se replică într-un mod deosebit. Prezența în virionul acestor virusuri, denumite oncornavirusuri sau retrovirusuri, a unei reverstranscriptaze face ca genomul ARN să fie copiat la un ADN complementar — ADNc — de polaritate negativă, de pe care se transcriu ulterior ARNm corespunzători. Uneori, ADNc poate fi integrat în genomul celular, putînd provoca transformarea celulară.

*

Replicarea virusurilor animale a fost și este studiată din două puncte de vedere, și anume :

— detaliile moleculare ale replicării virale ar putea fi intricate în patogeneza virală, iar prin definirea acestor procese sintetice în celulele infectate s-ar putea determina țintele pentru agenții chimioterapici și/sau imunologici ;

— virusurile animale servesc ca modele pentru cunoașterea replicării acizilor nucleici, pentru înțelegerea transcrierii și traducerii la diferite niveluri ale desfășurării lor.

Informațiile obținute prin analiza transferului de informație genetică conținută în genomurile virale ajută la descifrarea proceselor mult mai complexe care au loc în celulele eucariote. Virusurile cu ADN bicatenar, și în special cele care se replică în nucleu, mimează foarte bine transferul de informație de la genomul celular la proteine. Aceste virusuri servesc ca modele de studiu pentru transcrierea controlată a ARNm și a traducerii sale. Investigarea transcrierii virale a permis evidențierea unei serii de etape de prelucrare, în care se sintetizează inițial un transcript primar, ce este apoi prelucrat la ARNm funcțional, la fel ca și în celulele eucariote (Darnell, 1979).

În general, virusurile cu genom ADN prezintă o mare diversitate în ceea ce privește structura și conținutul lor în ADN, precum și modul lor de replicare. De asemenea, ele prezintă mari diferențe atît din punct de vedere al dependenței de funcțiile celulei-gazdă, cît și din punctul de vedere al inițierii infecției. Astfel, ADN de parvo-, papova-, adeno- și herpesvirusuri se replică în nucleu, unde se și asamblează în final virusurile respective, în timp ce poxvirusurile se multiplică în citoplasmă.

Informațiile asupra multiplicării virusurilor aparținînd unui gen particular provin de la datele obținute cu unul-două sisteme-model, alese de către experimentatori pentru ușurința cu care pot fi manipulate în scopul obținerii de informații. De obicei se optează pentru anumite mutante selectate în urma unor pasaje și alese pentru capacitatea lor de a crește rapid și la titruri mari, pe linii celulare convenabile.

În asocierea virusurilor ADN cu celulele s-au pus în evidență două tipuri principale :

— genomul virusului poate fi integrat în cel al celulei, replicîndu-se odată cu ADN celular. Rezultatul va fi fie o „infecție criptică“ (atunci cînd exprimarea genomului viral este total represată), fie o transformare morfologică a celulei, cu exprimarea unui număr limitat de gene ;

— cel mai adesea, genomul virusului se replică independent de genomul celular, ceea ce duce la apariția de noi virioni. Dacă virusul este citocid, funcțiile celulare sînt total oprite, iar celula va fi distrusă. Unele virusuri, mai rar, afectează funcțiile celulare în măsură mai mică și se poate înregistra concomitent multiplicarea celulară și cea virală.

6.2. REPLICAREA VIRUSURILOR CU GENOM ADN

6.2.1. REPLICAREA PARVOVIRUSURILOR

Parvovirusurile sînt virusuri mici, cu dimensiuni de 18—26 nm, cu simetrie icosaedrică și lipsite de înveliș. Ele ocupă un loc aparte între virusurile animale, avînd un genom format dintr-un ADN predominant monocatenar. Lucrările lui Bourguignon și colab. (1976) și Salzman și Fabish (1979) au arătat că la capetele 5′ și 3′ ale fiecărei molecule de ADN există zone dublu-catenare, cu structuri „în ac-de-păr“ (structuri „*fold-back*“ sau „*hair pin*“), care se formează datorită secvențelor complementare aflate în ultimele 160 și respectiv 115 nucleotide, sau prezintă secvenţe palindromice de 145 de nucleotide la ambele capete, după cum au stabilit Lusby şi colab. (1980). Masa moleculară a ADN este de 1,2—2,2$\times 10^6$ daltoni şi corespunde la circa 5 000 de nucleotide. Această cantitate de informaţie genetică este echivalentă unei singure gene, iar potenţialul ei de codificare ar trebui să fie de o singură proteină (Rose, 1974 ; Berns şi Hauswirth, 1978). Însă, în mod aparent paradoxal, capsida care adăposteşte genomul parvovirusurilor este formată din trei-patru proteine structurale, înrudite prin secvenţa lor în aminoacizi şi organizate în 32 de capsomere, după cum a arătat Rose (1974).

În funcţie de cerinţele lor pentru sinteza ADN viral, precum şi pe baza anumitor caracteristici structurale ale genomului viral, se deosebesc două grupe mari de parvovirusuri, şi anume :

— subgenul cu replicare autonomă, ale cărui particule virale conţin doar o catenă de ADN cu polaritate negativă, opusă polarităţii ARNm corespunzători ;

— subgenul defectiv, dependent, care pentru replicare are nevoie de un *helper* (virus ajutător) ; virusurile defective conţin fie o catenă cu polaritate negativă, fie o catenă cu polaritate pozitivă, dar, într-o populaţie dată de virusuri, numărul celor două categorii este echivalent (Rose, 1974 ; Berns şi Hauswirth, 1978).

Virusurile care se replică autonom includ virusuri izolate de la rozătoare (de exemplu, virusul Kilham al şobolanului), precum şi virusuri izolate de la alte specii animale, inclusiv omul (parvovirusul H1). Pentru sinteza ADN viral acest grup are nevoie ca celulele-gazdă să se afle fie în faza tîrzie S, fie în faza timpurie G_2 a ciclului de viaţă celulară, pentru a putea asigura factorii necesari sintezei de ADN viral. Pritchard şi colab. (1981) au precizat că replicarea virusului are loc în nucleu, întrucît sinteza de ADN viral depinde integral de enzimele celulei-gazdă, în special de ADN polimerază. Dintre virusurile cu genom defectiv cităm virusul adeno-asociat (cf. engl. *adeno-associated virus*, AAV).

Ciclul de multiplicare. Ciclul de multiplicare a parvovirusurilor a fost urmărit prin metode variate, cum ar fi formarea plajelor sub agar sau imunofluorescenţa. S-a stabilit astfel că pentru un parvovirus de şobolan, perioada latentă durează 6 ore, titrul maxim al virusului fiind atins după circa 28 de ore, deşi sinteza proteică a putut fi detectată după 12—15 ore de la infecţie. Parvovirusul uman H1 se exprimă mai lent, perioada sa latentă fiind de circa 10 ore, iar maximum de titru se realizează după 50 de ore. La virusurile dependente se observă o variaţie a perioadei latente în funcţie de momentul infectării cu *helper* ; astfel, dacă AAV a fost inoculat simultan cu adenovirusul *helper*, perioada latentă durează 12—16 ore, în timp ce la infectarea anterioară cu adenovirus şi abia apoi cu AAV perioada latentă scade la 4 ore.

Ciclul de replicare începe cu ataşarea parvovirusului la receptorii specifici aflaţi pe suprafeţele filopodiale sau pe arii nediferenţiate ale membranei celulare. Particulele virale pătrund în celulă prin viropexie şi se regăsesc în nucleu, sediul replicării virale, după circa 2 ore de la infecţie.

Replicarea parvovirusurilor autonome. După cum am menționat deja, ADN al parvovirusurilor cu replicare autonomă conține la ambele capete ale moleculei sale monocatenare cîte o structură „în ac-de-păr“, care este rezultatul complementarizării ultimelor 160 și respectiv 115 nucleotide de la capetele 5′ și 3′, deci formarea perechilor de baze are loc prin plierea ADN asupra lui însuși. În secvența 3′-terminală, nucleotidele de la 1 la 43 sînt complementare celor de la 73 la 115 ; în zona intermediară de curbură, de la 44 la 72, se află două regiuni bogate în reziduuri de guanină și citozină, care permit formarea unor perechi de baze suplimentare și care are drept rezultat apariția unor structuri secundare adiționale. Acestea conferă capătului 3′ al ADN parvoviral un aspect caracteristic în Y (Astel și colab., 1979).

Pentru replicarea ADN din parvovirusurile cu replicarea autonomă și pentru încapsidarea ADN, Tattersall și Ward (1976) au dat modelul prezentat în fig. 6-3 *I*. Pentru ca să înceapă replicarea ADN viral, capă-

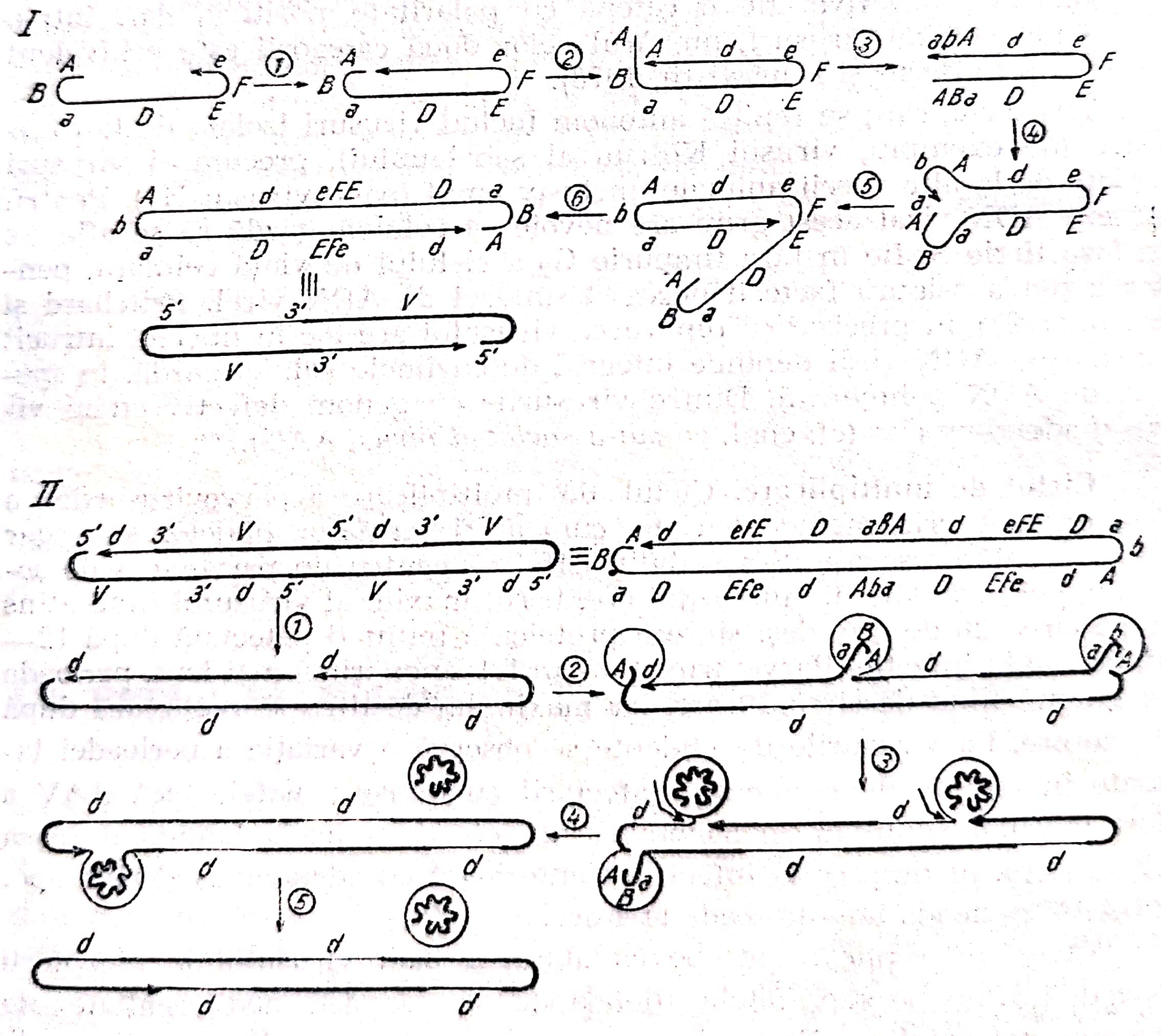


Fig. 6-3 — Modelul replicării ADN al parvovirusurilor autonome.
V — ADN viral ; *săgețile* — sinteza 5′ → 3′ (după Tattersall și Ward, 1976) (detalii în text).

tul 3′ servește ca amorsă *(primer)* (Rhode, 1977), apoi α-ADN polimeraza celulară copiază porțiunea liniară a ADN și trece spre capătul 5′, unde se află alt „ac-de-păr", îl liniarizează și îl copiază. Duplexul astfel format poate servi în continuare drept matriță pentru sinteza de ADN. Secvențele terminale 5′ și 3′ de la capătul deschis al duplexului se disociază, cu apariția a două structuri pliate, iar capătul 3′ poate servi din nou ca amorsă de replicare. Pe măsură ce se sintetizează, catena ADN viral progen deplasează catena opusă catenei-matriță, formînd astfel o matriță mai mare, care corespunde lungimii integrale a duplexului replicat.

Forma replicativă intermediară astfel constituită conține deci două copii ale catenei ADN viral, cu polaritate negativă, separate între ele de două catene complementare, cu polaritate pozitivă. În continuare, acești intermediari replicativi vor servi ca matriță pentru sinteza ulterioară a ADN viral, care va fi apoi rapid încorporat în particulele virale, după cum reiese din fig. 6-3 *II*.

Genomul parvovirusurilor este transcris de enzimele celulare din nucleul celular, cu formarea unui transcript primar. La rîndul său, acesta suferă modificări prin *splicing*, dînd naștere la trei molecule de ARN de 4,7, 3,0 și respectiv 2,8 kilobaze (kb). Analizînd structura primară a ARN de 2,8 și 3,0 kb, Green și colab. (1979) au arătat existența în aceste două molecule atît a unei secvențe comune, cu o lungime de 2,6 kb, cît și a capătului 3′-poliadenilat. Spre deosebire de ARN 4,7 kb, care are o localizare exclusiv nucleară, ARN 2,8 și 3,0 kb pot fi găsiți și în citoplasmă, unde se presupune că acționează ca mesageri pentru sinteza a două proteine structurale, cu masele de 68 000 și respectiv 88 000 daltoni.

În celulele infectate s-au mai identificat și alte două proteine, cu masa moleculară mai mică, de 65 000 și 44 000 daltoni, asociate capsidei virale, dar acestea par mai degrabă produse de scindarea proteolitică a proteinelor mai mari, codificate direct de către virus (Tattersall și colab., 1977). În acest mod, adică prin *splicing*-ul transcriptului primar și prin proteoliza limitată a produselor primare de traducere, genomul foarte mic al parvovirusurilor cu replicare autonomă poate da naștere la patru proteine structurale derivate de la o singură genă.

Maturarea particulelor virale începe imediat după sinteza ADN și a proteinelor virale. ADN progen se asociază rapid cu proteinele capsidale pentru a forma particule virale grele (HF) (cf. engl. *heavy full* = pline grele), care pot trece apoi în particule ușoare (LF) (cf. engl. *light full* = pline ușoare). S-a constatat că, la timpi corespunzînd conversiei particulelor HF în LF, are loc proteoliza polipeptidului capsidei de la 68 000 daltoni la 65 000 daltoni.

Replicarea parvovirusurilor dependente de helper. Pentru a se putea replica, unele parvovirusuri reclamă coinfectarea celulelor cu un virus ajutător *(helper)*. Un reprezentant tipic al acestui subgen viral este AAV, a cărui capsidă are dimensiuni similare și același număr de proteine ca și parvovirusurile cu replicare autonomă, dar prezintă diferențe în ceea ce privește unele aspecte ale structurii genomului respectiv.

Genomul AAV se distinge prin existența la ambele capete 3′ și 5′ a unor secvențe repetate invers, deci a unor palindroame de 145 de nucleotide, așa cum au precizat Lusby și colab. (1980). După cum reiese din fig. 6-4, nucleotidele 1—41 sînt complementare secvenței 125—85 și con-

```
  1– 41    AACCGGTGAGGGAGAGACGCGCGAGCGAGCGAGTGACTCCG
 42– 84    {GCCCGCTGG} TTT(CCAGCGGGC)T<GCGGGCCCG>AAA/CGGGCCCGC/
                     |       |           |    |         |       |       |
                    50      54          62   64        72      76      84
a
 85–125    CGGAGTCACTCGCTCGCTCGCGCGTCTCTCCCTCACCGGTT
125–145    GAGGTAGTGATCCCCAAGGA
  1–41     AACCGGTGAGGGAGAGACGCGCGAGCGAGCGAGTGACTCCG
 42–84     <GCGGGCCCG>TTT/CGGGCCCGC/A{GCCCGCTGG}AAA(CCAGCGGGC)
                     |       |           |    |         |       |       |
                    50      54          62   64        72      76      84
b
 85–125    CGGAGTCACTCGCTC GCTCGCGCGTCTCTCCCTCACCGGTT
125–145    GAGGTAGTGATCCCCAAGGA
```

Fig. 6-4 — Secvența de nucleotide a capătului 3′ al ADN-AAV. Nucleotidele 42—84 se află în „acul-de-păr" terminal în orientare *a* sau *b*. Complementaritatea bazelor în orientările *a* și *b* corespunde semnelor {}, (), //, < > (după Lusby și colab., 1980).

tribuie la formarea structurilor în „ac-de-păr". Nucleotidele 42—84 se pot afla fie în orientare *a*, fie în orientare *b*. În cadrul orientării *a*, nucleotidele 42—50 sînt complementare cu cele din zona 62—54, iar cele 64 —72 cu cele 84—76. În orientarea *b* sînt complementare aceleași secvențe, dar aranjarea lor reciprocă este diferită, ceea ce duce la apariția unor diferențe între acizii nucleici virali avînd nucleotide cu orientare *a* și *b*.

ADN izolat din particulele de parvovirusuri cu replicare dependentă de *helper* are fie polaritate negativă, fie polaritate pozitivă, numărul particulelor virale din cele două specii fiind egal în preparatele virale, după cum au arătat, printre alții, Berns și Adler (1972). Foarte interesant este faptul că în cursul replicării ADN, ambele catene pot servi ca matriță pentru sinteza catenelor complementare.

Lusby și colab. (1981) au oferit un model de replicare a ADN-AAV, prezentat în fig. 6-5. Conform acestuia, „acul-de-păr" de la capătul 3′ al catenelor — fie plus, fie minus — servește drept amorsă pentru sinteza ADN. ADN polimeraza α-celulară copiază regiunea monocatenară începînd de la amorsă și continuînd cu restul catenei-matriță. La capătul 3′ al catenei parentale, la nucleotidul 145 sau în apropierea lui, are loc o rupere endonucleolitică, după care structura în „ac-de-păr" se desfășoară, ajungînd secvența 5′-terminală a catenei progene, prezentă într-o orientare inversă relativ la orientarea originală din ADN parental. Apoi secvența 3′-terminală a catenei parentale este regenerată, utilizînd regiunea 5′ complementară a catenei progene drept matriță. La sfîrșitul sintezei, catenele se disociază, iar cele două copii progene — plus și minus — sînt imediat încorporate în capsida virală. Ca rezultat al acestui transfer permanent al secvențelor terminale, între ADN parental și cel progen, palindroamele interne prezente la capătul 3′ regenerat al catenei parentale sînt inversate și complementare față de palindroamele interne prezente la capătul 3′ al moleculei de ADN înainte de replicare. Deși modelul

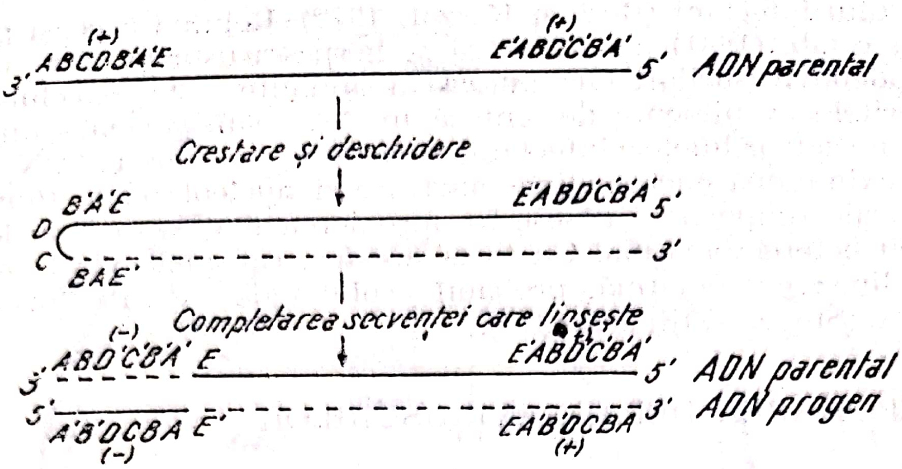


Fig. 6-5 — Replicarea ADN-AAV. Catena parentală (-) are secvenţe repetate invers, cu CD şi D'C' reprezentînd orientările palindroamelor interne (după Lusby şi colab., 1980).

de replicare a ADN descrie producerea doar a unei singure unităţi de catenă progenă, s-au izolat şi unii multimeri de ADN, ceea ce sugerează că, uneori, la replicarea parvovirusurilor dependente s-ar putea să funcţioneze şi un mecanism de replicare similar celui descris la parvovirusurile cu replicare autonomă, de către Hauswirth şi Berns (1979).

Transcrierea catenei de ADN negativ a AAV dă naştere la patru transcripţi, cu lungimile de 4,3 kb ; 3,6 kb (care pot fi identificaţi doar în nucleu) ; 2,6 şi respectiv 2,3 kb (care se regăsesc şi în citoplasmă) (Green şi colab., 1980). Deşi toţi aceşti ARN prezintă poliadenilarea capătului 3', doar specia 2,3 kb este predominant prezentă în polizomi şi deci ar reprezenta adevăratul ARNm. Se pare că ARN 2,3 kb, care conţine 2 250 de nucleotide, derivă de fapt din cel de 2,6 kb, prin pierderea unei secvenţe 5'-*leader,* de circa 50 de nucleotide şi a încă 300 de nucleotide (Green şi Roeder, 1980).

Pe baza experimentelor efectuate, Green şi Roeder (1980) au sugerat că ARN-AAV de 2,3 kb este tradus la o proteină capsidală majoră, cu masa moleculară de 66 000 daltoni, iar ARN de 2,6 kb ar putea fi şi el tradus fie la o proteină de 80 000 daltoni, fie la una de 90 000 daltoni. Apariţia unor proteine virale structurale mai mici a fost pusă pe seama unei proteolize limitate a proteinelor mari.

Replicarea AAV nu se poate desfăşura fără ajutorul oferit de un virus coinfectant, cum ar fi adenovirusurile sau, mai rar, herpesvirusurile. În cazul adenovirusurilor, pentru formarea AAV este necesară transcrierea anumitor gene timpurii, cerinţa minimă de ajutor constînd în transcrierea ordonată a genelor E1, E2A şi E4 (vezi „*Replicarea adenovirusurilor*"). Exprimarea acestora pune la dispoziţia parvovirusurilor dependente nişte proteine necesare replicării ADN, dar mecanismul lor de intervenţie este necunoscut în prezent.

Funcţia *helper* conferită de virusurile herpetice este incompletă şi, deşi se înregistrează replicarea ADN, transcrierea la ARN şi traducerea la proteine, nu s-au putut pune în evidenţă — în acest caz — asamblarea virusului infectant (Rose și Koczot, 1972). Reluînd aceeași problemă, Buller și colab. (1981) au arătat că și herpesvirusurile oferă un ajutor similar adenovirusurilor, dar numai în anumite sisteme celulare.

Diferitele evenimente de sinteză în AAV sînt asociate unor structuri din nucleii celulelor infectate, și anume replicarea ADN viral are loc în proximitatea eucromatinei nucleare și nucleolare, în timp ce proteinele virale timpurii se găsesc în apropierea membranei nucleare, împreună cu heterocromatina. Cu toate acestea, capsidele virale mature se regăsesc lîngă eucromatină, probabil acolo unde este localizată sinteza ADN-AAV (Singer și Rhode, 1978).

6.2.2. REPLICAREA HEPADNAVIRUSURILOR

Pentru moment, în acest grup au fost încadrate doar patru virusuri — virusul hepatitei B umane, virusul hepatitei *Marmotei monax (woodchuck hepatitis virus)* (WHV), virusul hepatitei lui *Spermophilus beecheyi (ground squirrel hepatitis virus)* (GSHV), virusul hepatitei B a raței de Pekin — *Anas domestica (duck hepatitis B virus)* (DHBV) — înrudite ca morfologie, ca ultrastructură, cît și prin comportarea lor în cursul unor reacții serologice.

Astfel, hepadnavirusurile au dimensiuni de 40—50 nm și sînt alcătuite dintr-un miez sferic, format din ADN, un antigen caracteristic (AgHBc, de la „*core*“=miez), precum și o polimerază ADN-dependentă, și dintr-un înveliș lipoproteic în care se găsesc antigenele de suprafață (AgHBs, în cazul HBV). Dar în particulele purificate ale hepadnavirusurilor au mai fost identificate și numeroase alte polipeptide minore. Genomul acestor virusuri este constituit de o moleculă mică de ADN circular cu 3 000—3 300 de nucleotide, parțial dublu-catenar. În cazul HBV, porțiunea monocatenară variază în limitele 15—60% din lungimea totală a ADN (Summers și colab., 1975; Hruska și colab., 1977). Molecula ADN constă deci dintr-o catenă lungă L, cu o lungime constantă de 3 182 de baze, indiferent de preparat, și o catenă scurtă S, a cărei lungime variază între 1 700—2 800 de baze.

Activitatea ADN polimerazică asociată virionului repară zona monocatenară, cu formarea unei structuri bicatenare complete. Această sinteză reparatorie se inițiază la capătul 3′ al catenei S, care se poate afla în dreptul a diferite locuri specifice de pe catena L. Sinteza se termină în momentul atingerii capătului 5′ al catenei S, capăt cu poziție fixă. De fapt, nici catena L nu constituie un cerc închis, ci prezintă o crestătură la o distanță de circa 300 de nucleotide de capătul 5′ al catenei S (Siddiqui și colab., 1979). Prin denaturarea selectivă a zonei de 300 de perechi de baze dintre capătul 5′ al catenei S și crestătura de pe catena S, ADN circular poate fi convertit la o formă liniară, cu capete coezive monocatenare. Prin reasocierea acestor capete, forma liniară poate fi recircularizată.

Ambele capete 5′ ale catenelor L și S par blocate, în scopul prevenirii fosforilării cu polinucleotidkinază; natura acestui blocaj este necunoscută, dar pare implicată o proteină legată covalent de catena L, proteină cu rol și în amorsarea sintezei ADN.

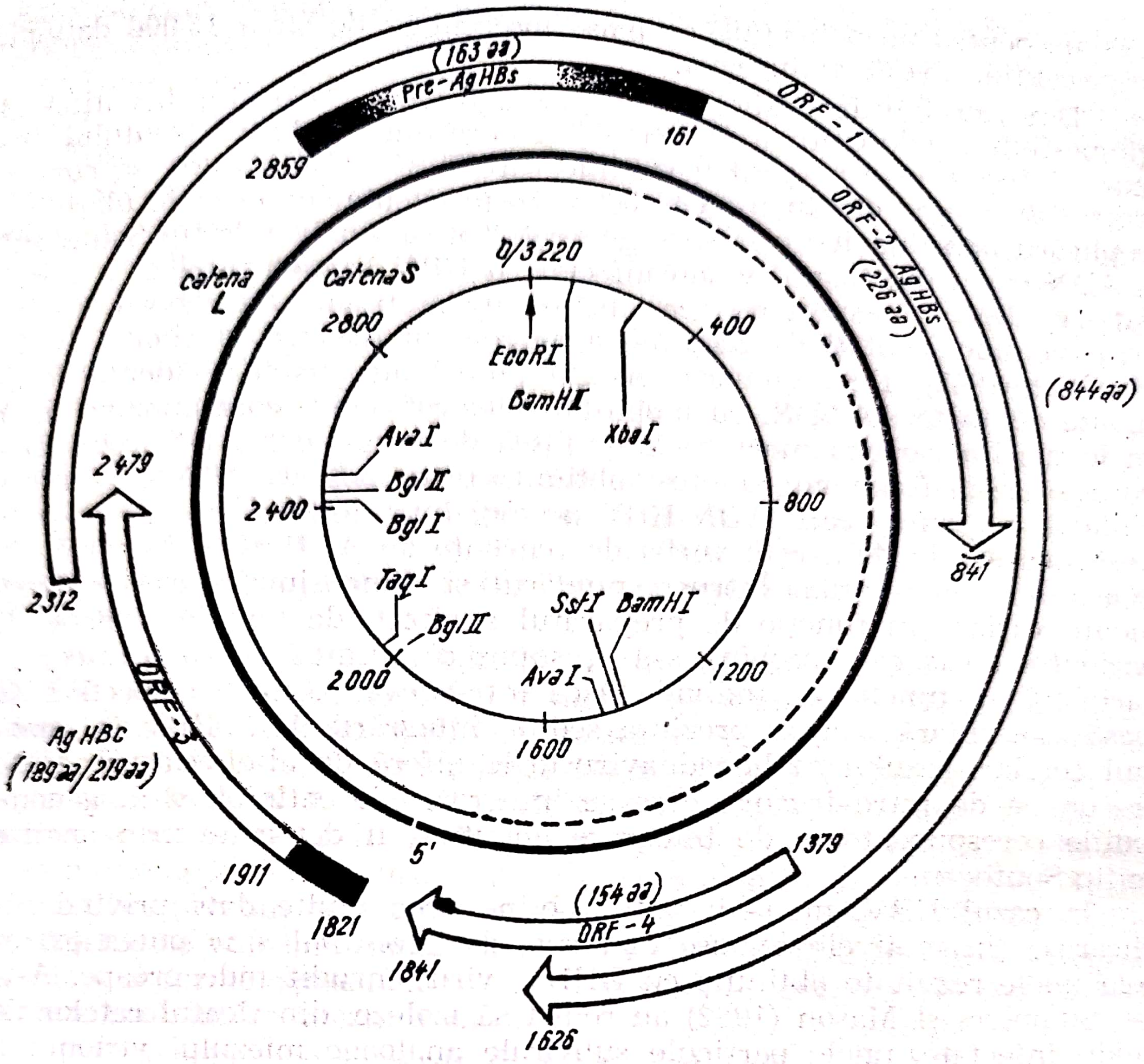

(163 aa)
Pre-AgHBs
ORF-1
161
2859
ORF-2 AgHBS
(226 aa)
(844 aa)
841
catena L
catena S
0/3220
EcoRI
BamHI
XbaI
2800
400
AvaI
BglII
BglI
2400
800
2479
2312
TaqI
BglII
SstI BamHI
2000
AvaI
1200
1600
ORF-3
Ag HBC
(189aa/219aa)
5'
1911
1821
1379
(154 aa)
ORF-4
1841
1626

Fig. 6-6 — Harta fizică a ADN din virusul hepatitei B, cu catenele L și S. Cercul interior reprezintă scala ADN în perechi de baze, pornind de la punctul 0, centrul de recunoaștere pentru *Eco* RI (după Marion și Robinson, 1983).

În genomul HBV prezentat în fig. 6-6 (Marion și Robinson, 1983) au fost identificate patru regiuni deschise de codificare (*open reading frame, ORF*). Astfel, *ORF*-2 conține gena S care specifică polipeptidul corespunzător antigenului major de suprafață. Codonul ei de inițiere ATG, corespunzător extremității N-terminale a polipeptidului, este de fapt abia al treilea triplet ATG din această zonă *ORF*, iar secvența nucleotidică ce codifică polipeptidul constituie doar una din jumătățile distale ale *ORF*-2. În ADN-HBV, secvența are 681 de nucleotide și codifică un polipeptid cu masa de 25 422 daltoni. *ORF*-3 conține gena C care specifică polipeptidul major al miezului viral ; ea codifică 188 de aminoacizi. Încă nu au fost identificate polipeptidele codificate de *ORF*-1 și *ORF*-4. Se observă că *ORF*-1 se suprapune total peste *ORF*-2 și, teoretic, are capacitatea de a codifica un polipeptid cu o masă de circa 95 000 daltoni. *ORF*-4 este secvența cu cel mai mic potențial de codificare, și anume pentru un polipeptid cu masa moleculară de circa 16 000 daltoni, care conține 154 de aminoacizi.

Din cauza dificultăților legate de cultivarea virusului hepatitei B (imposibilitate de cultivare pe celule și necesitatea folosirii țesutului hepatic infectat *in vivo* pentru studiile care îi sînt consacrate), se cunosc destul de puține detalii în ceea ce privește evenimentele moleculare ale replicării hepadnavirusurilor, în general. Totuși, analiza de tip Southern* a ADN izolat din ficatul uman infectat cu HBV în mod productiv a arătat că ADN are aspect de cerc închis superspiralat sau relaxat, corespunzînd unei unități de lungime a genomului (Buchot și colab., 1982; Shafritz, 1982). De asemenea, aceiași autori au pus în evidență fragmente distincte de ADN, cu mobilități electroforetice corespunzind unor molecule liniare mai mari decît unitatea de lungime a ADN viral. Deoarece aceste fragmente au fost obținute prin tratarea ADN cu enzima *Hind*III — pentru care ADN-HBV nu prezintă un situs specific — s-a presupus că, de fapt, este vorba de secvențe de ADN viral integrate în genomul celulei-gazdă. Întrucît numărul și dimensiunile acestor fragmente variază în funcție de preparatul analizat (de fapt, în funcție de pacientul de la care provin), s-a presupus că aceasta indică o integrare variabilă, în funcție de individ. Dacă într-adevăr benzile respective de masă moleculară mare reprezintă sediile integrării ADN-HBV în genomul celular, rezultă că hepadnavirusurile diferă de alte virusuri ADN, precum și de retrovirusuri, care se integrează la întîmplare în genom, sediile corespunzătoare de integrare neputînd fi detectate prin analize de tip Southern.

În cazul HBV, nu s-au putut obține prea multe date privind replicarea, din motivele expuse mai sus, dar eventual s-ar putea extrapola unele rezultate obținute cu DHBV, virus înrudit îndeaproape. Astfel, Summers și Mason (1982) au reușit să izoleze, din ficatul rațelor de Pekin infectate, unele particule subvirale analoage miezului virionului. Aceste particule au avut capacitatea de a încorpora dezoxiribonucleozidtrifosfați în ADN viral monocatenar, atît în catene negative, cît și în catene pozitive. Catenele pozitive nou-sintetizate s-au dovedit a fi rezistente la acțiunea nucleazei S1, spre deosebire de catenele negative sintetizate *de novo*, care sînt sensibile și deci, mai mult ca sigur, monocatenare. În schimb, sinteza catenei pozitive este sensibilă la actinomicină D, ceea ce sugerează că ea se formează pe o matriță ADN, în timp ce sinteza catenei negative, insensibilă, are loc în concluzie pe o matriță ARN. O altă dovadă a sintezei catenei negative pe matriță ARN a fost și observația că jumătate din noua catenă negativă sintetizată, deși încă legată de matriță prin punți de hidrogen, prezintă o densitate de plutire în gradient de Cs_2SO_4, la ultracentrifugare, situată între cea a hibrizilor ARN-ADN și cea a ARN. Proporția ARN în complecșii de sinteză variază invers-proporțional cu mărimea ADN. Această observație, alături de sensibilitatea la S1 a catenei negative născînde, sugerează degradarea

---

* Analiza de tip Southern constă în detectarea prin hibridizare a unor secvențe specifice de ADN în fragmente dezoxiribonucleotidice obținute prin diverse mijloace (hidroliză cu restrictaze, etc.) și separate electroforetic.

ARN de către o enzimă cu activitate de tip RNază H, pe măsură ce progresează sinteza catenei negative.

Toate aceste date, alături de cele ale lui Mason și colab. (1982) cu privire la existența în ficatul rațelor infectate cu DHBV a unui ARN de circa 3 000 de baze, poliadenilat la capătul 3′, ar putea indica o anumită strategie de replicare a hepadnavirusurilor. Pe baza rezultatelor obținute de diverși autori, Summers și Mason (1982) au propus un model de replicare pentru DHBV. Astfel, se presupune că în urma infecției cu DHBV, pe matrița de ADN viral se sintetizează o catenă de ARN de-a lungul întregii catene a genomului. Apoi intervine o reverstranscriptază care, folosind catena ARN sintetizată anterior, va sintetiza la rîndul ei o catenă ADN negativă, simultan cu degradarea ARN-matriță. Proteina atașată covalent la capătul 5′ al catenei negative ar putea juca rolul de amorsă pentru sinteza acestei catene. În continuare, o ADN polimerază ADN-dependentă (posibil să fie chiar cea asociată virionului) ar fi responsabilă de sinteza catenei pozitive. Asamblarea și eliberarea virionului ar putea avea loc abia după ce sinteza catenei pozitive atinge minimum 50%.

În viitor, trebuie dovedit că și alte hepadnavirusuri — în afara DHBV — se replică folosind o strategie asemănătoare. Deocamdată, din cauza imposibilității de studiu în culturi de celule, au rămas numeroase semne de întrebare, de exemplu ce rol ar putea îndeplini formele superspiralate ale ADN în celulele infectate cu hepadnavirusuri. Pe de altă parte, se cunoaște extrem de puțin despre transcrierea și traducerea genomului hepadnavirusurilor în vederea exprimării polipeptidelor AgHBs și AgHBc, precum și a altor produse ale genelor virale. Se știe totuși că AgHBs se exprimă numai cînd ADN-HBV se află în formă integrată și nu sub formă epizomală ; în aceste condiții însă nu se înregistrează sinteza proteinelor miezului viral.

De asemenea, se cunoaște destul de puțin despre sediile celulare ale sintezei componentelor virale și despre asamblarea acestora. În extractele citoplasmatice, Mason și colab. (1982) au pus în evidență forme mono- și bicatenare ale ADN viral. Studierea prin imunofluorescență a țesuturilor hepatice infectate cu HBV a arătat deci prezența AgHBc în nucleii celulari, iar AgHBs a fost evidențiat în citoplasmă și în membrana celulară externă.

6.2.3. REPLICAREA ADENOVIRUSURILOR

Dintre virusurile cu genom ADN la care schemele de transcriere și prelucrare (*processing*) a ARN au fost bine caracterizate, fac parte și adenovirusurile, care au sisteme complexe de transcriere și prelucrare, ce servesc ca modele și pentru înțelegerea evenimentelor similare petrecute în celulele eucariote.

Adenovirusurile constau dintr-un miez care conține un ADN dublucatenar, inclus într-o capsidă cu simetrie icosaedrică, cu dimensiuni de 70—90 nm. Capsida are 252 de capsomere vizualizate prin microscopie electronică ca unități distincte (Valentine și Pereira, 1965). La rîndul lui, fiecare capsomer este format din cîteva proteine virale structurale.

Capsomerele au fost denumite pentoni sau hexoni, după așezarea lor pe fețele icosaedrului (pentagoane și respectiv hexagoane). Pentonii au o constituție relativ complexă, ei fiind alcătuiți din mai multe componente nelegate covalent între ele, și anume o bază pentonică inserată între celelalte proteine ale capsidei și o fibră terminată cu un nod. Substructurilor pentonilor și hexonilor li se asociază o serie de caracteristici antigenice și funcționale ale adenovirusurilor. Astfel, fibrele reprezintă antigene majore specifice de tip, în timp ce hexonii conțin determinanți de reactivitate încrucișată, de grup, precum și unii determinanți antigenici specifici de tip (Petterson, 1971). Bazele pentonice s-au dovedit a fi toxice pentru culturile celulare, cărora le produc modificări morfologice ce determină apoi desprinderea blatului celular de pe suportul pe care a crescut.

Capsida externă și miezul adenovirusurilor sînt constituite din nouă proteine, după cum reiese și din modelul global dat pe baza propunerilor lui Brown și colab. (1975) pentru miez și ale lui Everitt și colab. (1975) pentru capsidă, în urma studiilor efectuate în special pe adenovirusurile tip 2 și 5.

Polipeptidele V și VII ale miezului, la care se leagă ADN viral, sînt bogate în arginină și pot neutraliza sarcinile negative ale ADN, în mod similar histonelor care se leagă la ADN celular. În plus, la capetele $5'$ ale catenelor ADN adenoviral este legată covalent, prin intermediul unor legături fosfodiesterice, o proteină cu masa moleculară de 55 000 daltoni. În particula virală această proteină leagă capetele ADN dînd naștere unei structuri circulare, au arătat Robinson și colab. (1975). Prin ruperea acestei legături proteice, ADN viral ia aspectul unei molecule liniare, dublu-catenare, cu o masă moleculară de 23×10^6 daltoni (Green și colab., 1967). În cazul serotipurilor cu un înalt potențial oncogenic, cum ar fi adenovirusurile 12, 18, 31, genomul este ceva mai mic, de $20-22 \times 10^6$ daltoni. De fapt, Steenbergh și colab. (1977) au stabilit că primele 102—103 nucleotide terminale de la fiecare capăt al ADN sînt secvențe repetate invers, puse în evidență prin metode de denaturare și „călire“ sau prin metode enzimatice, după cum reiese din fig. 6-7. În această orientare, lanțul superior al ADN, care este transcris spre dreapta, este desemnat *r* (cf. engl. *right* = dreapta), în timp ce lanțul inferior al ADN, care este transcris spre stînga, este notat cu *l* (cf. engl. *left* = stînga).

Întreaga lungime a ADN dublu-catenar adenoviral a fost divizată în 100 de unități de cartare (*map units*, mu), de cîte 350 de perechi de baze (pb) fiecare, ce servesc la desemnarea centrilor de transcriere din genom și la orientarea diverselor zone ale ADN față de capetele moleculei. Punctul zero al hărții corespunde capătului stîng al moleculei, iar punctul 100 — celui drept (Richardson și Westphal, 1981).

In vitro, la fel ca și papovavirusurile, adenovirusurile se replică eficient doar în celulele derivate de la speciile animale pentru care ele provoacă infecții endemice.

Serotipul viral, tipul de celule, prezența unui virus *helper* constituie tot atîția factori care influențează tipul de infecție cu adenovirusuri, care poate lua diverse aspecte, și anume :

— infecții productive, litice, cu formare de particule virale progene mature în celulele permisive ;

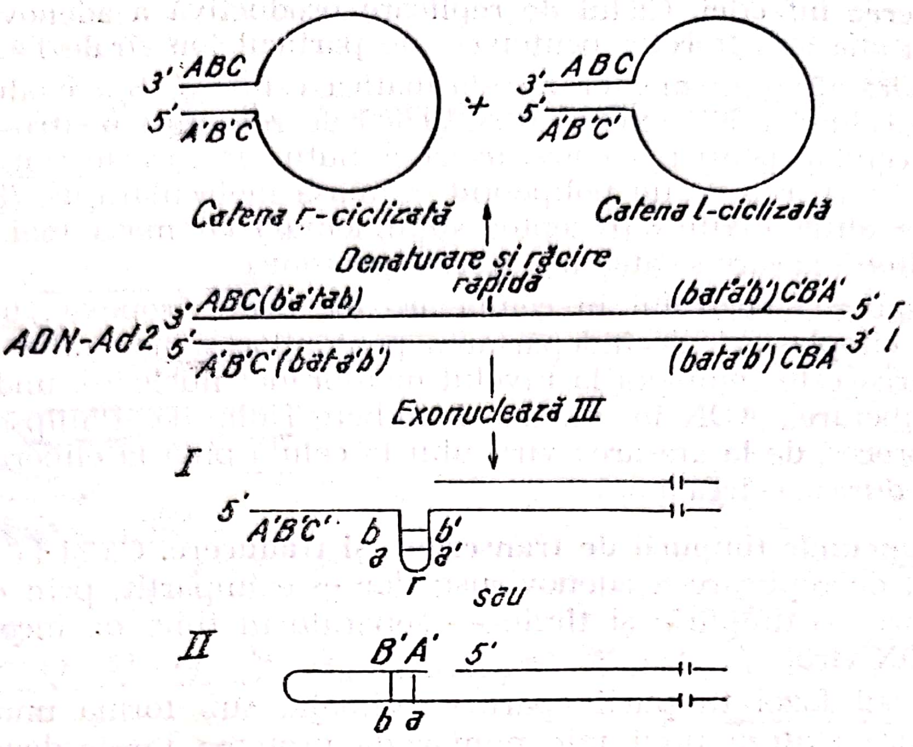


Fig. 6-7 — Evidenţierea palindroamelor şi a repetiţiilor terminale din structura ADN a adenovirusului 2, prin experienţe de denaturare şi răcire rapidă sau prin studii enzimatice (după Wold şi colab., 1976).

— infecţii abortive, în care secvenţe de ADN viral se leagă covalent la genomul celular, inducînd ulterior transformarea celulelor respective nepermisive.

De exemplu, adenovirusurile umane nu pot produce infectarea productivă a celulelor simiene, dar coinfectarea cu virus simian 40 (SV40 din grupul Papova) aduce cofactorul necesar, astfel încît adenovirusurile umane se vor replica complet şi pe acest substrat. Pe de altă parte, unele adenovirusuri pot induce transformarea unor celule, cu o rată de 1 transformare/10^4—10^6 particule virale infectante. Eficienţa transformării depinde şi ea de tipul de celule, de multiplicitatea de infecţie, de numărul de pasaje pe care le-au suferit celulele etc. Între aceste două limite se situează infecţiile semiproductive, în care în aceeaşi populaţie apar atît celule cu infecţii productive, cît şi celule cu infecţii abortive.

Ciclul de replicare. Ciclul de replicare a adenovirusurilor are o durată mare, în care perioada de eclipsă variază atît în funcţie de sistemul virus — celulă-gazdă, cît şi de multiplicitatea de infecţie, dar de obicei durează 13—18 ore. Replicarea genomului începe la 6—12 ore de la infecţie şi se termină după 24—30 de ore, maximum de sinteză fiind atins după 15—18 ore. Proteinele pentonice apar foarte rapid după intrarea virusului în celulă, şi anume după circa 2 ore, spre deosebire de proteinele hexonice, care pot fi puse în evidenţă abia după 12—16 ore de la debutul infecţiei.

Inițierea infecției. Ciclul de replicare productivă a adenovirusurilor începe cu atașarea fibrelor pentonice ale particulelor virale la receptorii glicoproteici aflați în membrana plasmatică celulară. S-a evaluat că pe suprafața celulelor KB există circa 10 000 de receptori pentru Ad2. Receptorul celular pentru adenovirusuri a putut fi caracterizat, stabilindu-se că este vorba de un polipeptid cu masa moleculară de 78 000 daltoni și un altul auxiliar (receptor suplimentar) cu masa mai mică, de 42 000 daltoni, la care se atașează fibrele pentonice.

Pătrunderea virusului în celulă are loc prin viropexie, urmată, în interiorul citoplasmei, de îndepărtarea pentonilor și hexonilor adiacenți. Decapsidarea este completă la nivelul membranei nucleare, unde se produce și eliberarea ADN în nucleu Longberg-Holm și Philipson, 1969). Întregul proces, de la atașarea virusului la celulă pînă la eliberarea ADN în nucleu, durează circa o oră.

Evenimentele timpurii de transcriere și traducere. Ca și la alte virusuri, ciclul de replicare a adenovirusurilor este împărțit, prin convenție, în două faze — timpurie și tîrzie — separate în timp de începerea replicării ADN viral.

În cursul fazei timpurii apare exprimată, sub forma unor ARNm care dirijează sinteza unui mic număr de proteine virale, doar o parte a informației conținută în genomul viral. În acest moment, ARNm viral constituie doar o mică proporție din ARN total existent în celulă; pe măsură ce începe replicarea ADN, cantitatea de ARNm viral crește dramatic, astfel că după 18 ore de la infecție el reprezintă practic în totalitate ARNm legat la poliribozomi (ARNm tîrzii, care apar după inițierea sintezei replicative a ADN viral, orientează biosinteza proteică în sensul formării masive de proteine virale structurale).

După ce ADN adenoviral a fost eliberat în nucleu, cele două catene ale genomului încep să fie transcrise de către ARN polimeraza (II) ADN-dependentă celulară (Longberg-Holm și Philipson, 1969). Transcrierea aceasta timpurie începe la 1—4 ore după infectarea celulelor. Prin studii de hibridizare, efectuate de numeroși cercetători, cum ar fi Tibbetts și Patterson (1974) sau Wold și colab. (1977), s-a ajuns la concluzia că ARNm timpurii sînt complementari într-o măsură mai mare catenei *r* decît catenei *l*. Transcrierea timpurie E (cf. engl. *early* = timpuriu) constituie un proces controlat, în care șase regiuni separate și distincte ale genomului viral servesc ca matrițe pentru sinteza ARN (Westphal și Lai, 1977; Pettersen și colab., 1976). Evans și colab. (1977) au constatat că fiecare regiune a ADN care este transcrisă în primele momente ale infecției are un promotor propriu pentru inițierea transcrierii ARNm respectivi; acești promotori au fost desemnați ca E1A, E1B, E2A, E2B, E3 și E4 (Berk și Sharp, 1977). ARNm corespunzători E1A, E1B și E3 sînt transcriși de pe catena *r*, pe cînd ARNm corespunzători promotorilor E2A, E2B și E4 sînt transcriși de pe catena *l*; atît pe catena *r*, cît și pe catena *l* transcrierea se face în sens 5′→3′ (fig. 6—8).

Lucrările lui Chow și colab. (1979), printre alții, au arătat că cei mai mulți ARNm adenovirali se formează prin *splicing*-ul unor transcripți primari. Exonii, adică secvențele ARN care se mențin în produsul final

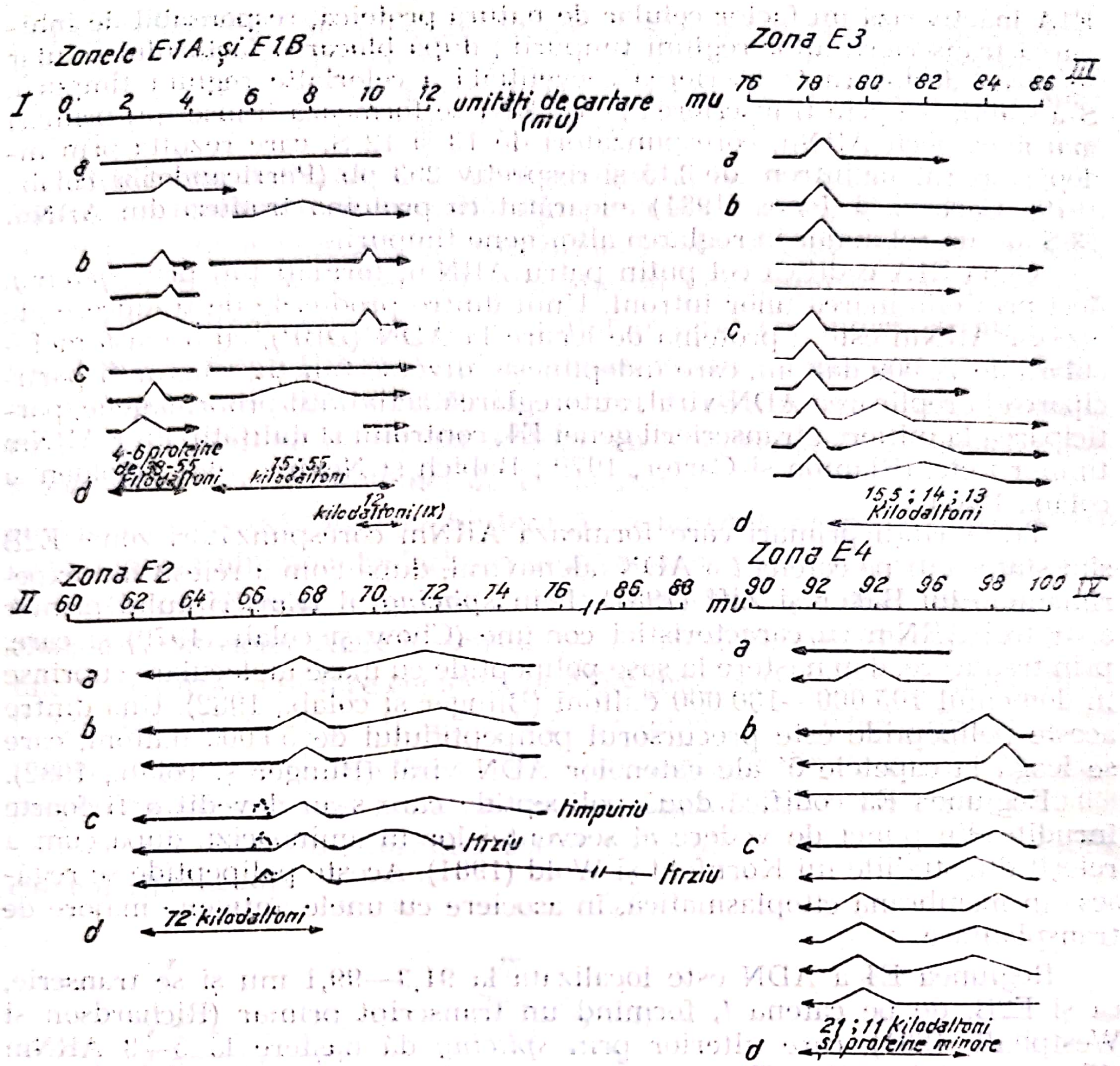

Zonele E1A și E1B
I 0 2 4 6 8 10 12 unități de cartare (mu)
a
b
c
4-6 proteine de 38-55 kilodaltoni
15; 55 kilodaltoni
12 kilodaltoni (IX)
d
Zona E3
mu 76 78 80 82 84 86 III
a
b
c
15,5 ; 14 ; 13 Kilodaltoni
d
Zona E2
II 60 62 64 66 68 70 72 74 76 86 88
a
b
c
timpuriu
tîrziu
tîrziu
72 kilodaltoni
d
Zona E4
mu 90 92 92 96 98 100 IV
a
b
c
21 ; 11 kilodaltoni și proteine minore
d

Fig. 6-8 — Speciile timpurii de ARNm adenoviral și polipeptidele corespunzătoare, notate după Kitchingman și colab., (1977).
—— — zone timpurii E1A-E1B-E2-E3-E4 ; *a-c* — specii de ARNm ; _/\_— intronii ; *d* — polipeptidele timpurii ; *săgețile* — sinteza 5′ → 3′.

matur, se reunesc într-un mod specific, cu menținerea cadrului original de citire. Ulterior mai au loc și alte modificări posttranscripționale ale ARNm, și anume : poliadenilarea capătului 3′ și formarea structurilor 5′-cap (Weil și colab., 1979 ; Salditt-Georgieff și colab., 1980). De asemenea, se mai înregistrează și metilarea adenozinelor interne la N6.

Dintr-o serie de lucrări a reieșit că ordinea de exprimare a genelor timpurii ar fi E1A→E4→E2, deși alte lucrări au propus ordinea E1A→E2→E4 (Richardson și Westphall, 1981 ; Nevins și Winkler, 1980). Berk și colab. (1979) au precizat că transcrierea genei E1A este indispensabilă pentru celelalte gene timpurii, iar traducerea ei pare a fi implicată în transformarea celulară (Carlock și Jones, 1981). Date relativ recente, reieșite din cercetările lui Nevins (1981), au sugerat că produsul genei

E1A inactivează un factor celular de natură proteică, responsabil de inhibarea transcrierii altor regiuni timpurii ; după blocarea factorului celular se poate desfășura transcrierea secvențială a celorlalte regiuni timpurii. S-a stabilit că prin transcrierea genei E1A se formează transcripți primari mai mari decît ARNm corespunzători de 13 și 12 S, care rezultă prin îndepărtarea unor introni de 115 și respectiv 253 pb (Perricaudet și colab., 1979). Carlock și Jones (1981) au arătat că proteina tradusă din ARNm 13 S are un rol major în reglarea altor gene timpurii.

Gena E1A codifică cel puțin patru ARNm, formați toți prin *splicing*, deci prin eliminarea unor introni. Unul dintre produsele de traducere ale acestor ARNm este o proteină de legare la ADN (DBP), cu o masă moleculară de 72 000 daltoni, care îndeplinește diverse funcții, cum ar fi participarea la replicarea ADN viral, autoreglarea activității propriei gene, participarea la inițierea transcrierii genei E4, controlul stabilității altor ARNm timpurii etc. (Blanton și Carter, 1979 ; Babich și Nevins, 1981 ; Golden și colab., 1981).

Transcripții primari care formează ARNm corespunzători zonei E2B sînt sintetizați pe catena *l* a ADN adenoviral, după cum a reieșit din experimentele lui Baker și Ziff (1981). Prin *splicing*-ul transcriptului primar apar trei ARNm cu caracteristici comune (Chow și colab., 1979) și care, prin traducere, dau naștere la șase polipeptide cu mase moleculare cuprinse în domeniul 105 000—130 000 daltoni (Blinger și colab., 1982). Una dintre aceste polipeptide este precursorul polipeptidului de 55 000 daltoni, care se leagă la capetele 5′ ale catenelor ADN viral (Blinger și colab., 1982).

Regiunea E3 codifică două polipeptide care s-au dovedit a fi foarte înrudite din punct de vedere al secvenței lor în aminoacizi, după cum a reieșit din studiile lui Kornfeld și Wold (1981). Aceste polipeptide se regăsesc în membrana citoplasmatică, în asociere cu unele antigene majore de transplantare.

Regiunea E4 a ADN este localizată la 91,3—99,1 mu și se transcrie, ca și E2B, de pe catena *l*, formînd un transcript primar (Richardson și Westphall, 1981), care ulterior prin *splicing* dă naștere la 5—8 ARNm (Chow și colab., 1979 ; Tiggers și Raskas, 1982). Relativ recent, Tiggers și Raskas (1982) au realizat traducerea acestor ARNm, obținînd 16 polipeptide, cu funcții deocamdată neidentificate.

De fapt, nici funcțiile altor proteine timpurii nu au fost încă stabilite cu rigurozitate, dar se pare că, în general, ele ar fi implicate în inițierea sau/și menținerea sintezei ADN viral progen, precum și în controlul transcrierii.

Deși cele mai multe proteine virale structurale sînt sintetizate tîrziu în cursul infecției, ARNm corespunzători la două proteine structurale, și anume proteina IX (asociată hexonilor) și proteina IVa2 (corespunzătoare fibrelor pentonice), încep să fie sintetizați chiar în cursul perioadei timpurii. ARNm pentru proteina IX nu suferă fenomenul de *splicing* și parțial secvența lui se suprapune unei secvențe nucleotidice întîlnită și în ARNm corespunzător genei E1B (Aelstrom și colab., 1980).

În faza timpurie se mai transcriu încă cel puțin două specii de ARN asociate virusului (cf. engl. *virus-associated*, VA), care aparent nu se traduc la proteine și despre care se presupune că ar fi implicate în *splicing*-ul speciilor de ARNm, precum și în reglarea traducerii ARNm virali în special în fazele tîrzii ale infecției. Logan și Shenk (1982) presupun că VA-ARN ar putea lega mesagerii virali pentru a facilita traducerea lor sau că prezența acestor acizi nucleici ar influența legarea anumitor factori celulari la ARNm virali, în scopul inițierii traducerii.

Replicarea ADN. Sinteza ADN adenoviral își are sediul în nucleii celulari, iar realizarea ei necesită atît prezența enzimelor celulare, cît și participarea unor proteine specific virale. Pentru a putea fi replicat, ADN adenoviral parental trebuie să aibă atașată la capătul său 5′ o proteină de 55 000 daltoni, după cum au arătat o serie de autori, printre care Challberg și Kelly (1979). În plus, aceiași autori au precizat că la debutul sintezei replicative a ADN, la capătul 3′ se asociază o altă proteină, cu masa moleculară de 80 000 daltoni, cu o secvență de aminoacizi asemănătoare cu cea a proteinei de la capătul 5′ (Challberg și Kelly, 1981) și cu rol de amorsă *(primer)*. Sinteza ADN nascent începe cu adiția dCMP (acid dezoxicitidinmonofosforic) la proteina-amorsă, cu formarea unei legături esterice. Ulterior intervine α-ADN polimeraza celulară, care produce elongarea catenelor ADN în sensul 5′→3′, cu deplasarea catenelor parentale pe măsură ce se face copierea la ADN progen (Lechner și Kelly, 1977 ; Winnacker, 1978). Un alt complex proteină de 80 000 daltoni-dCTP inițiază replicarea și pe a doua catenă parentală. În final, catenele de ADN progen complementare, avînd atașată la capătul lor 5′ proteina de 80 000 daltoni, vor hibridiza, formînd astfel molecula matură de ADN dublucatenar (fig. 6—9).

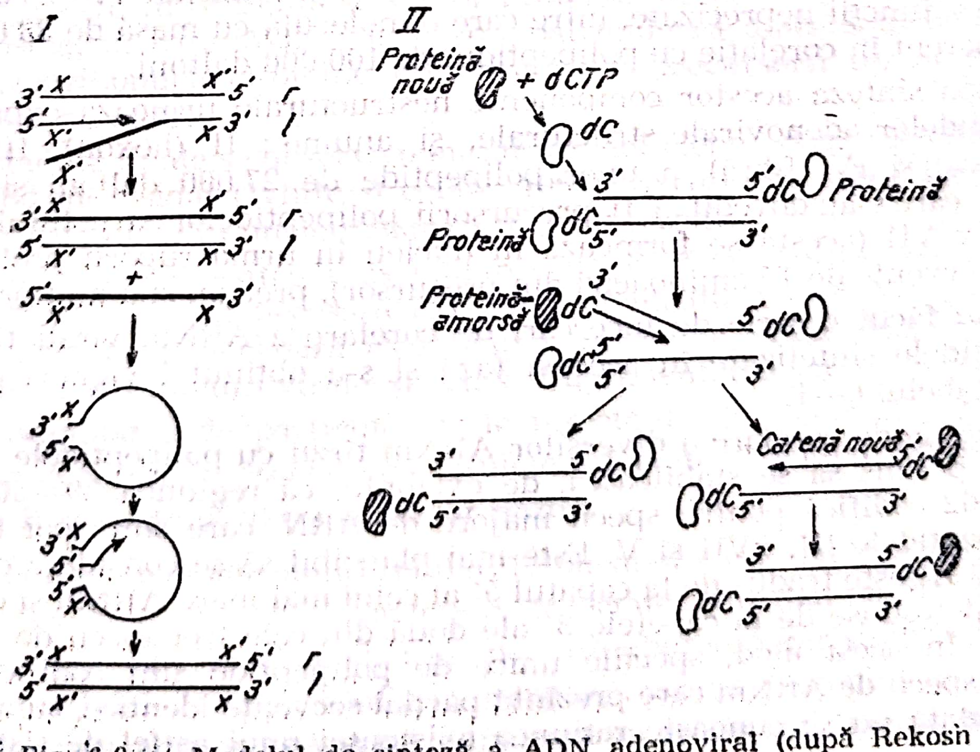


Fig. 6-9 — Modelul de sinteză a ADN adenoviral (după Rekosh și colab., 1977) (detalii în text).

Se pare că în cursul stadiilor tîrzii ale infecției, posibil în cursul maturării particulelor virale, proteina de 80 000 daltoni suferă o proteoliză limitată, fiind convertită la specia de masă 55 000 daltoni.

Pentru sinteza ADN progen este necesară și prezența DBP cu masa de 72 000 daltoni, menționată anterior. Deși se cunoaște că acest tip de proteine se leagă la ADN monocatenar, nu i s-a descifrat pentru moment funcția exactă.

Evenimentele tîrzii de transcriere și traducere. Transcrierea ARNm tîrzii are loc concomitent cu debutul sintezei replicative a ADN (Carter și Ginsberg, 1976). ARNm tîrzii sînt 80% complementari catenei *r* și numai 20% catenei *l*, după cum au dovedit lucrările lui Tibbetts și colab. (1974), Smiley și Mak (1976) etc. La poziția 16 mu pe catena *r* începe sinteza unui transcript primar (Evans și colab., 1979), care pe măsură ce este produs suferă mai multe ruperi interne, formîndu-se în acest mod cinci ARN, precursori pentru cîte un grup de ARNm (Salditt-Georgieff și colab., 1980). Capetele 3′ astfel apărute se poliadenilează, după cum a reieșit din studiile lui Weber și colab. (1980), iar la capetele 5′ apare structura „cap“. ARNm proveniți de la unul și același precursor au o serie de caracteristici comune, cum ar fi prezența aceleiași secvențe *leader*, precum și un centru identic de poliadenilare, dar diferă prin cantitatea de ARN îndepărtată prin *splicing* de la capătul 5′ al regiunii de codificare (Zeevi și colab., 1981).

Exprimarea ARNm tîrzii se traduce prin sinteza unor polipeptide nestructurale și structurale tîrzii. Astfel, în celulele infectate cu adenovirusuri s-a pus în evidență prezența unui polipeptid nestructural major, cu masa de 100 000 daltoni, a cărui funcție nu este cunoscută deocamdată, dar care pare a fi asociat cu unele particule ribonucleoproteice mesagere virale. În aceleași celule, în fazele tîrzii ale infecției au mai fost puse în evidență numeroase alte polipeptide minore, cu mase de 11—95 000 daltoni și cu funcții neprecizate, între care o moleculă cu masă de 33 000 daltoni, aparent în corelație cu polipeptidul de 100 000 daltoni.

După sinteza acestor componente nestructurale urmează exprimarea polipeptidelor adenovirale structurale, și anume: II (hexon), III (bază pentonică) și IV (fibră), a unor polipeptide de 27 000 daltoni și 20 000 daltoni, care s-au dovedit a fi precursorii polipeptidelor structurale VI și respectiv VII (acesta se formează în nucleu în urma ruperii proteolitice a unei secvențe de 15 aminoacizi din precursor), precum și a multor altora.

S-au făcut o serie de încercări de corelare a ARNm virali tîrzii cu polipeptidele sintetizate în aceeași fază și s-a obținut imaginea prezentată în tabelul 6—I.

Studiile de corelare a diverșilor ARNm tîrzii cu polipeptidele respective au permis să se stabilească, de exemplu, că regiunea 39—50 mu a ADN-Ad2 codifică pentru specii majore de ARN, care sînt apoi traduse la polipeptidele III, pVII și V. Este mai plauzibil să se considere că polipeptidul III este tradus de la capătul 5′ al celui mai mare ARNm și că pVII și V sînt traduse de la capetele 5′ ale două din cele trei specii de ARNm rămase. În acest mod, speciile unice de polipeptide sînt codificate de diverse specii de ARNm care prezintă parțial secvențe identice, suprapuse. Deocamdată nu se cunoaște rațiunea existenței unui astfel de sistem de reglaj.

TABELUL 6-1

Compararea maselor moleculare ale polipeptidelor virale tîrzii cu capacitatea aparentă de codificare a ARNm corespunzători (după Anderson și colab., 1974)

Polipeptid	Funcție	Masă moleculară (daltoni)	ARNm	
			Coeficientul de sedimentare (S)	Capacitate de codificare (daltoni)
II	hexon	120 000	23	120 000
100 000 daltoni	necunoscută	100 000	27	165 000
III	bază pentonică	70 000	25	145 000
IV	fibră	62 000	19	82 000
V	proteină minoră de miez	48 500	16	62 000
pVII	precursor al proteinei majore de miez	20 000	21	103 000
IX	asociată hexonului	12 000	9	15 000
etc.				

Asamblarea adenovirusurilor și eliberarea lor. Maturarea particulelor adenovirale are loc în nucleii celulelor infectate și durează 13—20 de ore. Totuși, la fel ca și în cazul altor virusuri cu replicare nucleară, ARNm produși în nucleu trebuie transportați în citoplasmă pentru a fi traduși, apoi proteinele virale timpurii și tîrzii — acestea din urmă fiind produse în cantități mari — sînt transportate din nou în nucleu. Ulterior, proteinele tîrzii se asociază cu ADN viral pentru formarea virusului progen. În nucleu are loc asamblarea pentonilor și a hexonilor, a precursorilor preVI și preVII, în prezența și a altor proteine minore. Se formează astfel o precapsidă, în care ADN adenoviral pătrunde ca atare sau sub forma unei dezoxiribonucleoproteine preformate cu precursorii pV și pVII ai proteinelor de miez.

În stadiile finale se observă o maturare ineficientă, doar 10% din ADN viral fiind încapsidat (White și colab., 1969). Excesul de ADN viral și de proteine acumulate în nucleu apar ca incluzii bazofile.

Reamintim că pentru reasamblarea unor adenovirusuri cu caracter infectant este absolut necesară existența în mediu a argininei ; absența acestui aminoacid blochează asamblarea virionilor, chiar dacă în celule s-au sintetizat proteine virale și ADN. Suplimentarea cu arginină restabilește asamblarea de particule virale infectante. În general, particulele virale progene rămîn asociate cu celulele infectate și numai puține particule vor fi regăsite în afara celulelor-gazdă.

Alterarea metabolismului celular. Replicarea virală afectează sintezele macromoleculare ale celulelor-gazdă infectate. Imediat după infecția virală, unele tipuri de adenovirusuri pot stimula temporar sinteza de ADN celular în celulele care nu se află în diviziune, iar acest eveniment depinde de exprimarea genelor E1A și E2, după cum au arătat Braithwaite și colab. (1981) și Rossini și colab. (1981). După circa 8 ore de la infecție, sinteza

ADN scade, în timp ce sinteza proteinelor celulare este redusă după 12 ore (Raskas și colab., 1970). Deși infecția cu adenovirus inhibă diviziunea celulară, celulele nu sînt lizate, păstrîndu-și niveluri foarte scăzute de activitate metabolică.

Cu toate că scopul acestei prezentări a fost să descrie ciclul de replicare virală productivă, în cazul adenovirusurilor trebuie să se menționeze și o altă relație virus — celulă-gazdă. S-a arătat că în condiții apropriate, unele virusuri pot infecta celulele, modificîndu-le caracteristicile de creștere, fără ca să se producă moartea celulară. Acest proces, denumit *transformare*, provoacă alterări ale unor proprietăți observate la celulele normale. Adenovirusurile au fost studiate extensiv la nivel molecular pentru elucidarea funcțiilor virale implicate în transformare, precum și a factorilor necesari virusului pentru a induce tumori (Tooze, 1973).

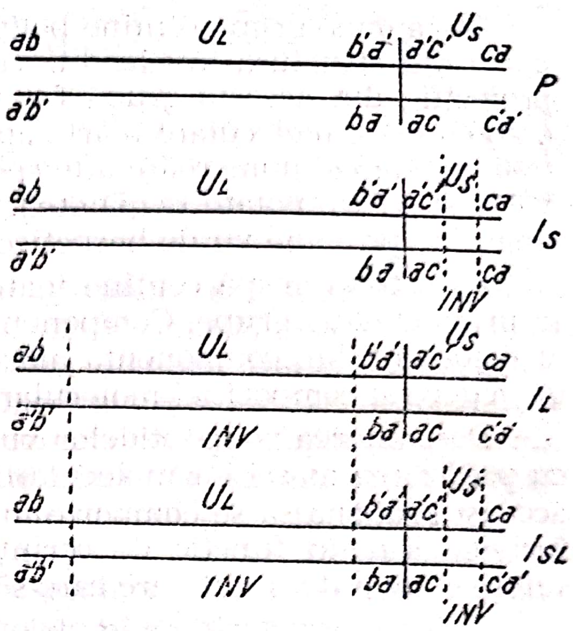
6.2.4. REPLICAREA HERPESVIRUSURILOR

Virusurile herpes simplex, tipurile 1 și 2, au fost intens studiate, inclusiv la nivel molecular. Particulele HSV prezintă patru elemente morfologice distincte : un miez opac la microscopia electronică (opacitatea datorîndu-se prezenței ADN viral dublu-catenar, ale cărui molecule sînt înfășurate în jurul unui mănunchi toroidal de proteine) ; o capsidă icosaedrică formată din 162 de capsomere care include miezul ; un material amorf, cu o posibilă structură fibroasă, puternic refringent pentru electroni, denumit tegument (Roizman și Furlong, 1974) și care învelește capsida ; un înveliș sau membrană, a cărui suprafață externă prezintă mici „spiculi" de circa 8 nm lungime. Acestui înveliș îi sînt asociate cel puțin cinci glicoproteine virale, dintre care unele sînt chiar proiecțiile („spiculii") menționate, inserate într-un dublu strat lipidic, provenit din membranele celulare alterate. În general, diametrul virionilor de herpes este de 100—200 nm, în funcție de grosimea variabilă a tegumentului și a membranei.

ADN-HSV tip 1 și 2 este liniar și are o masă moleculară de 96×10^6 daltoni, cu un potențial real de codificare de 86×10^6 daltoni, dacă se înlătură regiunile care nu se traduc în final la proteine, conform calculelor lui Roizman și colab. (1981). Teoretic, acest genom poate codifica 60—70 de proteine, dar în celulele infectate s-au detectat doar vreo 50 de proteine induse de infecția virală herpetică (Powell și Courtney, 1975).

ADN-HSV prezintă unele caracteristici, între care deosebită este prezența unor crestături ale legăturilor fosfodiesterice în ambele catene ale ADN, puse în evidență de Frenkel și Roizman (1972) și Wilkie (1973) ; o particularitate a ADN de herpesvirus constă și în aranjamentele diferite pe care le poate avea în molecula respectivă o secvență dezoxiribonucleotidică unică, aranjamente demonstrate de Roizman (1979). Molecula de ADN liniar dublu-catenar constă din două regiuni legate covalent, desemnate L și S, și acoperind 82% și respectiv 18% din lungimea catenelor de ADN viral. Fiecare component constă dintr-o secvență unică corespunzătoare, notate U_L și U_S (Sheldrick și Berthelot, 1975), mărginite fiecare de repetiții inversate (Wadsworth și colab., 1975).

Fig. 6-10 — Cei patru izomeri de ADN de herpesvirus. ---- secvenţele unice inversate (după Roizman, 1979) (detalii în text).



După cum reiese din fig. 6—10, secvenţele *ab* şi *b'a'* flanchează regiunea U_L (reprezentînd 6% din molecula ADN), iar secvenţele *a'c'* şi *ca* flanchează zonele U_S (constituind 4,3% din molecula ADN) ; se observă chiar şi în această schemă redundanţa secvenţei terminale *a* (Wadsworth şi colab., 1976). Pentru moment nu se cunoaşte semnificaţia acestor fapte. ADN de herpesvirus, izolat fie din virusul purificat, fie din celulele infectate, constă din patru izomeri rezultaţi în urma a patru aranjamente relative diferite ale regiunilor unice deja menţionate. Ca moleculă-prototip s-a dat aranjamentul U_L+U_S, iar celelalte trei orientări posibile sînt : U_L+U_S inversat ; U_L inversat$+U_S$; U_L inversat $+U_S$ inversat. S-a constatat că în particulele virale izolate dintr-o singură plajă există cantităţi echimoleculare din toţi cei patru izomeri ai ADN, ceea ce indică apariţia lor în cursul ciclurilor succesive de infecţie şi pornind chiar de la nivelul unei singure celule infectate.

În virionii herpetici s-au pus în evidenţă şi numeroase polipeptide, al căror număr variază între 15 şi 33, dintre care unele glicozilate, după cum au arătat între alţii Spear şi Roizman (1972), Becker şi Olshevsky (1972), Strnad şi Aurelian (1976). Discrepanţele, în ceea ce priveşte numărul speciilor polipeptidice, sînt provocate de mai multe cauze, cum ar fi imperfecţiunea tehnicilor de analiză, cantitatea variabilă a componentelor minore sau momentul studiului, care poate permite uneori şi evidenţierea unor precursori. Studiile efectuate asupra organizării polipeptidelor virale au permis identificarea a trei grupe de polipeptide, şi anume :

— prima grupă include cel puţin şase polipeptide existente în nucleocapsidă anterior adăugării învelişului ; VP5, cu o masă moleculară de 151 000 daltoni, este considerat polipeptidul major al nucleocapsidei, existent în 850—1 000 de copii, alături de VP21 (42 500 daltoni), VP22a (37 500 daltoni) şi alte componente minore ;

— a doua grupă conține polipeptide glicozilate, cele mai multe făcînd parte din structura învelișului viral sau constituindu-se sub forma unor proiecții ; din această grupă fac parte VP8 (sau gC), VP7 (gB) și VP8,5 (gA) cu mase moleculare foarte apropiate ca valoare 129 000—119 000 daltoni, precum și numeroase alte specii (VP12,3 și VP12,6, desemnate și gE ; VP17 și VP18, notate și gD etc.). Se pare că aceste polipeptide constituie singurele proteine virale herpetice expuse la exterior ;

— a treia grupă conține toate celelalte specii polipeptidice neincluse în primele două grupe. Componenții ei sînt mai mult ca sigur constituenți ai tegumentului, componentă morfologică insuficient cunoscută din punct de vedere al compoziției moleculare.

Desemnarea polipeptidelor virusurilor herpetice nu se face în general cu precizarea masei lor moleculare aparente, deoarece s-ar putea ca una și aceeași proteină să se comporte în mod diferit, după cum este sau nu fosforilată, sau, în funcție de cerințele ciclului de replicare virală, ele să sufere o anumită prelucrare care să le modifice masa moleculară.

Pe baza localizării lor în virion, polipeptidelor respective li s-au putut atribui unele funcții. Astfel, polipeptidele nucleocapsidei au rol în încorporarea și condensarea ADN în miezul viral, în timp ce polipeptidele tegumentului sînt implicate probabil în adsorbție și pătrundere în celulă. Polipeptidului VP23 (asociat nucleocapsidei) i s-au atribuit proprietăți enzimatice, kinazice. De asemenea, s-a mai identificat în nucleocapsidă o activitate ATPazică.

Ca o caracteristică a particulelor de herpesvirusuri se menționează existența în virionii purificați a unor poliamine, cu posibil rol în condensarea ADN, ale cărui sarcini le neutralizează (Gibson și Roizman, 1971 ; McCormick, 1978).

Ciclul de replicare. În cazul herpesvirusurilor, perioada de eclipsă durează circa 8 ore. În celulele HEp-2 infectate cu HSV tip 1, proteinele virale s-au putut pune deja în evidență după 2 ore, procesul lor de sinteză atingînd un maximum după aproximativ 8 ore. Pentru ADN viral se înregistrează molecule progene la 3 ore după infecție, cu un maximum la 9 ore. Perioada latentă a virusului durează 10 ore, titrul maxim fiind detectat la 15 ore de la infecție.

Inițierea infecției. Ciclul litic al infecției cu HSV începe prin adsorbția particulelor virale la receptorii de la suprafața celulelor, proces mediat probabil de către glicoproteina de înveliș gD (Spear, 1980).

În stadiile timpurii ale infecției cu virusuri herpetice un rol deosebit revine învelișului viral. Această afirmație se bazează pe faptul că infectivitatea specifică a nucleocapsidei fără înveliș este mult mai mică decît cea a virionilor compleți ; la rîndul ei, infectivitatea ADN herpetic este mai redusă comparativ cu cea a virionului sau a nucleocapsidei.

Pătrunderea herpesvirusurilor în celula-gazdă are loc mai ales prin viropexie (Dales și Silverberg, 1969), dar se pare că uneori — așa cum au dovedit-o unele studii de microscopie electronică întreprinse de Miyamoto și Morgan (1971) — mai intervine și fuziunea. În acest proces, un rol critic revine glicoproteinelor gB și gC (Sarmiento și colab., 1979). Ca urmare, nucleocapsida se eliberează în citoplasmă. Apoi, ADN viral pătrunde în nucleu printr-un mecanism necunoscut la ora actuală, servind în continuare drept matriță pentru transcrierea timpurie a ADN, efectuată de ARN polimerazele celulare.

Deocamdată nu se știe nimic despre modul în care se dezasamblează nucleocapsida și dacă ADN este total deproteinizat cînd ajunge în nucleu sau dacă îi mai rămîn asociate unele proteine virale, care anume și ce funcție ar putea îndeplini.

Evenimentele timpurii de transcriere și traducere. Datorită existenței în celulele infectate cu herpesvirusuri a unor cantități relativ mari de ARNm, Honess și Roizman (1979) au putut distinge trei mari perioade de transcriere secvențială, în cascadă : imediat-timpurie (α), timpurie (β) și tîrzie (γ), caracterizate de proteinele corespunzătoare apărute în urma traducerii mesagerilor respectivi. Studiile efectuate au arătat că grupurile de proteine β și γ sînt neomogene, iar grupul β — la rîndul său — se împarte în alte două subgrupe — β_1 și β_2 — corespunzător anumitor proprietăți comune ale componentelor respective. O caracteristică a sintezei polipeptidelor virusurilor herpetice constă în aceea că ea nu se realizează cu aceeași viteză pentru toate speciile grupului. În plus, ordinea secvențială, în cascadă, deja menționată, implică producerea în cursul ciclului replicativ al herpesvirusurilor a cel puțin două tranziții, de la α- la β- și apoi la γ-polipeptide. Fiecare tranziție presupune încetarea sintezei precedentului grup de polipeptide virale.

În cazul ADN-HSV s-a constatat că transcrierea timpurie-imediată și propriu-zisă implică 35—40% din molecula genomului. Apariția ARNm la polizomi în cursul acestor etape ale ciclului de replicare virală poate fi controlată prin diverse mecanisme, cum ar fi transcrierea selectivă a ADN (Clements și colab., 1977 ; Jones și Roizman, 1979) sau transportul selectiv al ARN de la nucleu la citoplasmă, prelucrarea diferită și diferențiată a ARN (Kozak și Roizman, 1974 ; Jacquemont și colab., 1980) sau chiar stabilitatea variată a ARNm. Fiecare dintre aceste mecanisme a fost dovedit experimental, dar cele mai multe studii confirmă transcrierea selectivă a ADN de către ARN polimeraza celulară ADN-dependentă II, căci, deși conține numeroase polipeptide structurale, virionul herpetic nu prezintă o enzimă proprie de transcriere.

Imediat după infecție, ARN polimeraza celulară transcrie de pe ADN viral parental pentru ARNm imediat-timpurii, de tip α, puși în evidență de Mackem și Roizman (1981), Silver și Dales (1982) etc. În cea mai mare parte acești ARNm sînt transcriși fie de pe secvențele repetate inverse, fie din zone adiacente acestora (Clements și colab., 1977). Trascrierea a doi ARNm se face de pe o catenă, iar a celorlalți doi de pe cealaltă catenă a ADN viral ; datele reieșite din lucrările lui Watson și colab. (1981) arată că cel puțin doi din acești patru α-ARNm apar prin *splicing*-ul unor transcripți primari.

După ce α-ARNm au fost transportați în citoplasmă, urmează traducerea lor, cu formarea polipeptidelor α, sinteză care atinge un maximum la 2—4 ore după infecție (Honess și Roizman, 1979). Funcția polipeptidelor virale α nu este total elucidată, deși unele par să acționeze ca DBP iar, pe de altă parte, prezența lor în celulele infectate este absolut necesară pentru ca să poată avea loc transcrierea timpurie (β) (Watson și Clements, 1980) și, ulterior, traducerea corespunzătoare, care are ca rezultat sinteza a circa 15 polipeptide. Maximum de sinteză în etapa β este atins după 5—7 ore de la infectarea celulelor (Honess și Roizman, 1977).

Acestei clase de proteine β i s-au atribuit o serie de funcții, printre care blocarea rapidă a sintezei α-ARNm, inițierea și continuarea sintezei ADN viral, precum și inițierea și transcrierea γ-ARNm. Tot în această fază timpurie se înregistrează și apariția unora din proteinele structurale capsidale, fapt destul de rar la virusurile ADN. Unele din enzime participă la sinteza ADN viral, și anume o ADN polimerază cu activitate 3'- și 5'-exonucleazică (Knopf, 1979), o timidinkinază (Dubbs și Kit, 1964), o dezoxicitidindezaminază (Chan, 1977) și posibil o ribonucleotidreductază (Huszar și Bacchetti, 1981).

Replicarea ADN. În fig. 6—10 s-a prezentat schema structurii ADN al herpesvirusurilor, cu caracteristica sa cea mai pregnantă — existența celor patru izomeri rezultați prin orientarea relativă diferită a anumitor secvențe dezoxiribonucleotidice din alcătuirea moleculelor respective. În aceste condiții, trebuie înțeles că, deși replicarea și izomerizarea ADN din virusurile herpetice decurg independent, cele două procese sînt înrudite îndeaproape, orice referire la replicare trebuind să ia în considerare izomerizarea și reciproca.

Cu toate că lipsesc dovezile neechivoce în această problemă, se pare că cei patru izomeri nu sînt total echivalenți în ceea ce privește capacitatea lor de a exprima toate funcțiile necesare producerii unor progeni infectanți, după cum a reieșit din lucrările lui Morse și colab. (1977).

La replicarea ADN viral participă, în plus față de enzimele induse de virus (deci polipeptide virale nestructurale în cea mai mare parte), și o serie de enzime celulare, al căror aspect s-a modificat în urma infecției herpetice.

Pentru explicarea mecanismului prin care se produc în cursul infecției cei patru izomeri ai ADN viral, Roizman (1979) a propus un model de sinteză, prezentat în fig. 6-11. Astfel, ADN-prototip (P) este supus acțiunii unei exonucleaze (*1*), care expune segmentele *a* și *a'* de la capetele opuse. Se formează în acest mod capete coezive, ceea ce duce la circularizarea ADN (*2*), care va deveni matriță pentru sinteza unor concatemeri, prin mecanismul inelului rotator (*3*). ADN concatemeri formați sînt clivați fie la secvențele *c'a'*, fie la cele *a'b'*, iar ADN dublu-catenar apărut în acest mod este lipsit la capete de secvențele *a* și *a'*. Capetele incomplete sînt regenerate, pentru fiecare catenă, prin plierea joncțiunii U_L—U_S. De exemplu, toată lungimea moleculei-prototip se formează la secvența *c* a uneia din catene, prin complementarizarea internă cu *c'* din secvența *b'a'a'c'*. În mod similar, secvența c'-terminală se complementarizează cu secvența *c* din *baac (4)*. Secvența *a'* se sintetizează pe *a* ca matriță și reciproca (*5*, *6*). Perechile de baze intracatenare din P disociază, iar zona U_S se pliază, fără a fi inversată. Totuși, în această etapă este posibilă și realizarea inversiunilor, cu formarea izomerului I_S (*6*, *7*), care la replicare va da, la rîndul lui, naștere unui izomer I_{SL}, alături de P și I_S etc. (*8*, *9*) (Roizman, 1979).

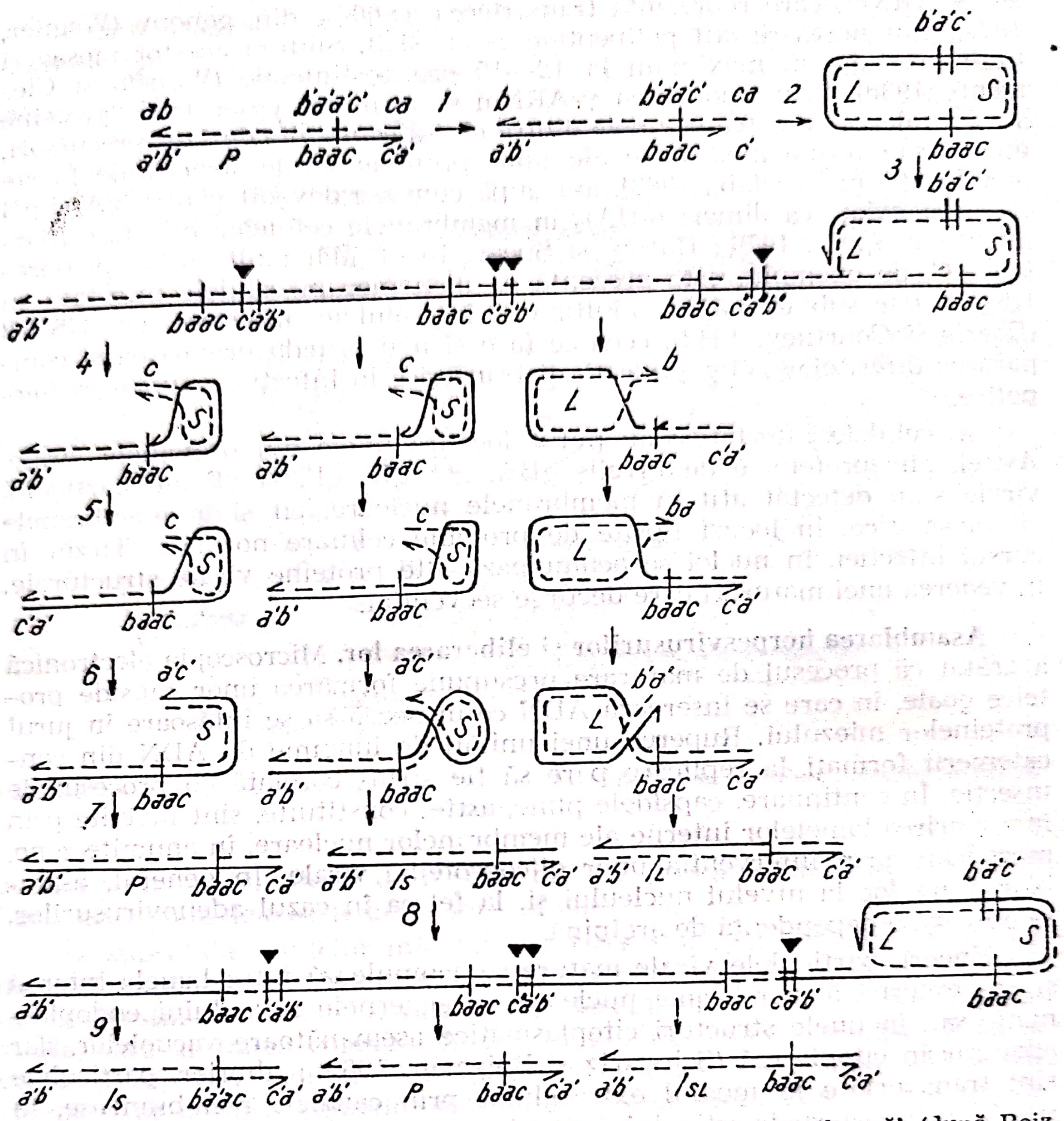

ab
b'a'a'c' ca
1
b
b'a'a'c' ca
2
b'a'c'
L
S
a'b'
P
baac
c'a'
a'b'
baac
c'
baac
3
b'a'c'
L
S
a'b'
baac c'a'b'
baac c'a'b'
baac c'a'b'
baac
4
c
S
a'b'
baac
c
S
a'b'
baac
b
L
baac
c'a'
5
c
S
c'a'
baac
c
S
a'b'
baac
ba
L
baac
c'a'
6
a'c'
S
a'b'
baac
a'c'
S
a'b'
baac
b'a'
L
baac
c'a'
7
a'b'
P
baac
c'a'
a'b'
Is
baac
c'a'
a'b'
IL
baac
c'a'
8
b'a'c'
L
S
a'b'
baac c'a'b'
baac c'a'b'
baac c'a'b'
baac
9
a'b'
Is
b'a'ac
c'a'
a'b'
P
baac
c'a'
a'b'
IsL
baac
c'a'

Fig. 6-11 — Replicarea ADN de herpesvirus și formarea izomerilor săi (după Roizman, 1979) (detalii în text).

Smiley și colab. (1981) au adus o serie de dovezi care pledează însă pentru recombinarea repetițiilor inversate în regiunile unice anterior formării concatemerilor și chiar înainte de replicarea ADN (și nu după), cum reiese din modelul lui Roizman (1979). În plus, ruperea ADN concatemeri la unități de lungimea ADN viral este strîns legată de inserarea ADN în particulele virale în cursul maturării (Ladin și colab., 1980). S-ar putea ca, cel puțin în acest stadiu al replicării virale, rapida încapsidare a ADN să prevină inversiunile.

Evenimentele tîrzii de transcriere și traducere. Pe parcursul sintezei ADN începe și transcrierea ARNm de pe ADN progen. Pentru transcrierea γ-ARNm, care reprezintă transcrierea a 60% din genom (Wagner, 1974), sînt necesare atît polipeptide α, cît și β. Sinteza acestor mesageri tîrzii prezintă un maximum la 12—15 ore postinfecție (Watson și Clements ,1980). Prin traducerea γ-ARNm se formează circa 33 de proteine structurale ; s-ar putea ca unele dintre ele să constituie de fapt precursori, dimeri sau forme modificate ale unor proteine virale structurale foarte înrudite (Para și colab., 1982), așa după cum s-a dovedit pentru gA și gB care pot exista ca dimeri $(gBA)_2$ în membranele celulelor infectate (Sarmiento și Spear, 1979 ; Haffey și Spear, 1980). Mai mult chiar, glicoproteina C, de exemplu, este prezentă ca monomer în celulele infectate cu HSV-1, dar sub formă de multimeri în celulele infectate cu HSV-2 (Eberle și Courtney, 1982), ceea ce face și mai dificilă urmărirea și compararea diferitelor polipeptide tîrzii transcrise în infecția cu virusuri herpetice.

În celulele infectate s-au putut localiza unele din proteinele virale. Astfel, glicoproteinele de înveliș gBA, gC, gD, gE, și gF ale particulei virale s-au detectat atît în membranele nucleare, cît și în membranele citoplasmatice, în locuri lipsite de proteine celulare normale. Tîrziu în cursul infecției, în nuclei se acumulează alte proteine virale structurale, în vederea unei maturări care decurge secvențial.

Asamblarea herpesvirusurilor și eliberarea lor. Microscopia electronică a arătat că procesul de maturare presupune formarea unor capside proteice goale, în care se inserează ADN ce urmează să se înfășoare în jurul proteinelor miezului. Ruperea unei unități de lungime de ADN din concatemerii formați la replicare pare să fie strîns corelată cu procesul de inserție. În continuare, capsidele pline, astfel constituite, sînt învelite prin înmugurirea lamelelor interne ale membranelor nucleare, în anumite zone, modificate prin intervenția unor glicoproteine virale. În general, asamblarea are loc la nivelul nucleului și, la fel ca în cazul adenovirusurilor, se observă o dependență de arginină.

Uneori, particulele virale mature se acumulează între lamela internă și cea externă a membranei nucleare, în cisternele reticulului endoplasmatic sau în unele structuri citoplasmatice asemănătoare vacuolelor, dar apar rar în citoplasmă (Schwartz și Roizman, 1969) ; ulterior, particulele sînt transportate în mediul extracelular prin canalele membranoase, în special prin cisternele reticulului citoplasmatic.

Fig. 6-12 redă în mod schematic replicarea herpesvirusului.

Alterarea metabolismului celular. Infecția cu herpesvirusuri afectează organizarea celulară la două niveluri, întrucît s-au observat modificări atît în structurile celulare, cît și în asocierile celulare. Sinteza proteinelor celulare și a ADN cromozomal celular este puternic depresată de proteinele virale (Honess și Roizman, 1979 ; Ben-Porat și colab., 1971).

În cursul infecției herpetice s-a observat fragmentarea cromozomilor, care se reașază la interiorul membranei nucleare, așa încît centrul nucleului devine liber pentru sinteza virală.

S-a constatat de asemenea alterarea asocierilor celulare, datorită balonizării celulelor, urmată de apariția unor sinciții, în care rolul principal revine glicoproteinei gB (Manservigi și colab., 1977). Interacțiunile de

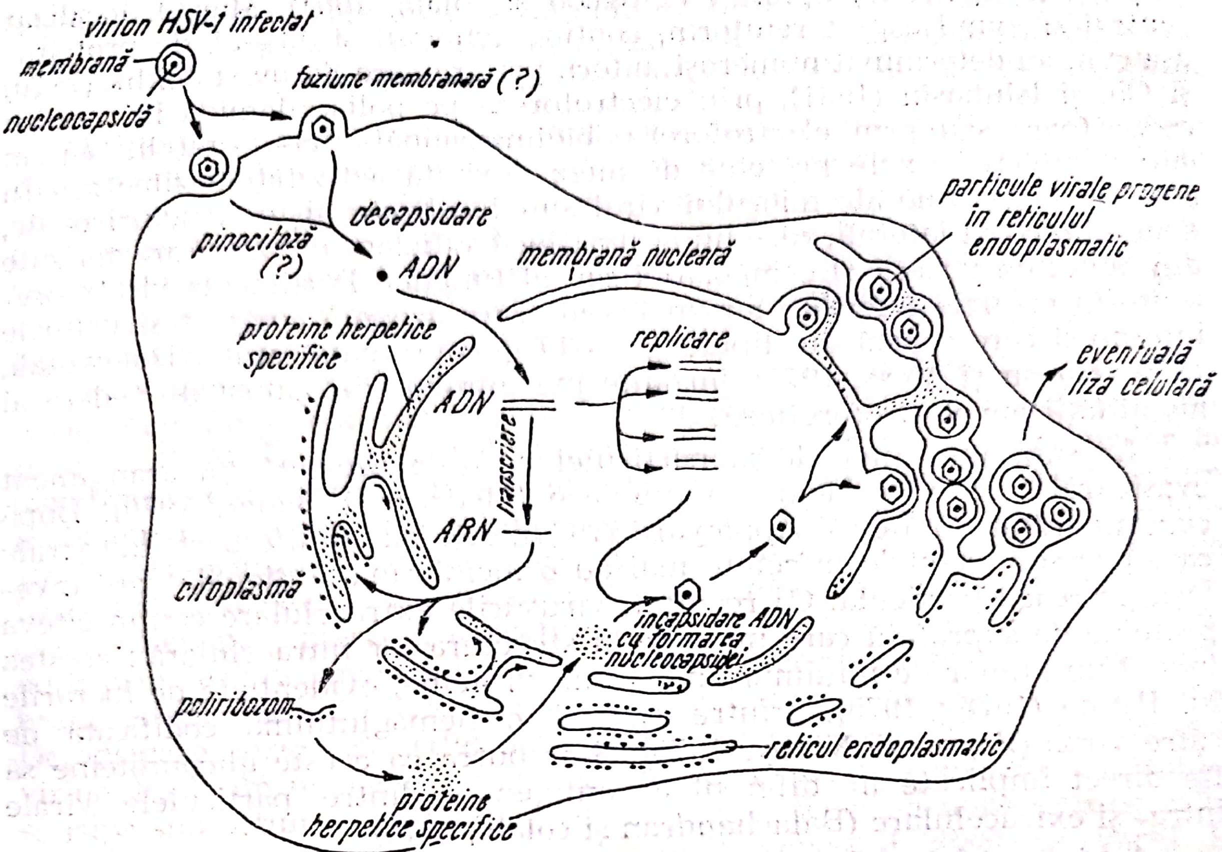

virion HSV-1 infectat
membrană
nucleocapsidă
fuziune membranară (?)
pinocitoză (?)
decapsidare
ADN
membrană nucleară
particule virale progene în reticulul endoplasmatic
proteine herpetice specifice
replicare
ADN
transcriere
ARN
eventuală liză celulară
citoplasmă
încapsidare ADN cu formarea nucleocapsidei
poliribozom
reticul endoplasmatic
proteine herpetice specifice

Fig. 6-12 — Schema replicării virusului herpes simplex în celulele permisive (după Watson, 1977).

acest tip sînt potențate și de o serie de alte proteine codificate de ADN viral, precum și de o serie de factori celulari.

Pe suprafața celulelor infectate cu HSV sau alte herpesvirusuri, s-a detectat exprimarea unui receptor pentru porțiunea Fc a imunoglobulinei G (Westmoreland și Watkins, 1974). Receptorii pentru Fc sînt proteine virale, care ar putea corespunde fie lui gE, fie altora, înrudite (Para și colab., 1982). S-a sugerat că atașarea IgG normală sau imună la acești receptori ar permite celulelor infectate să supraviețuiască în organismul gazdei.

La fel ca și în cazul adenovirusurilor, trebuie să se menționeze și un alt tip de relație virus — celulă-gazdă, și anume faptul că, uneori, herpesvirusurile pot induce transformări sau chiar tumori.

6.2.5. REPLICAREA POXVIRUSURILOR

Genul poxvirusurilor include virusurile cu cele mai mari dimensiuni, de 250—390 nm×200—250 nm, al căror genom codifică numeroase proteine, dintre care unele cu activitate enzimatică, incluse și neincluse în virion. Virusul-prototip, intens studiat la nivel molecular, îl constituie virusul vaccinal (Moss, 1974 ; Moss, 1979). Ca și alte poxvirusuri, cel vaccinal are o capsidă completă, compusă din cîteva substructuri : miez, corpi laterali, înveliș lipidic (Westwood și colab., 1964). Miezul, localizat central și avînd aspect reniform, conține genomul și 13—21 de proteine, așa cum au determinat numeroși autori, printre care Sarov și Joklik (1970) și Oie și Ishihashi (1981), prin electroforeză pe poliacrilamidă în condiții reducătoare sau prin electroforeză bidimensională. S-a stabilit că în cursul infecției unele proteine de miez prezintă activități enzimatice. În scobiturile laterale ale miezului viral sînt localizate niște structuri ovale, denumite corpi laterali, care nu au fost încă suficient de bine caracterizate din punct de vedere al compoziției sau al funcției. Particulele virale prezente în celulele infectate au un înveliș care acoperă complet structurile interne și care constă din lipide și 2—14 glicoproteine virale (Holowczak, 1970 ; Garon și Moss, 1971), înrudite îndeaproape din punct de vedere al mobilității lor electroforetice.

La suprafață, morfologia particulelor virale prezintă un aranjament cvasiparalel al unor elemente tubulare (Medzon și Bauer, 1970). După cum au arătat Boulter și Appleyard (1973), cele mai multe particule virale care părăsesc celulele infectate mai au o membrană adițională care învelește întreaga particulă. Ca rezultat, virusurile extracelulare conțin cîteva proteine de suprafață care nu apar în structura lor intracelulară ; acestea includ un număr de minimum nouă glicoproteine, evidențiate de lucrările lui Payne (1978 ; 1979), printre care și o hemaglutinină codificată de către virus (Payne și Norby, 1976). S-ar putea ca aceste glicoproteine să fie direct implicate în diferențele antigenice dintre particulele virale intra- și extracelulare (Balachandran și colab., 1979).

Acidul nucleic adăpostit de miezul viral este o moleculă de ADN bicatenar, mare, cu o masă moleculară de 120×10^6 daltoni (McCarron și colab., 1978 ; Grady și Paoletti, 1977) și ale cărui capete sînt legate covalent (Geshelin și Berns, 1974 ; Holowczak, 1976). Teoretic, un genom avînd aceste dimensiuni are o capacitate de codificare de 150—200 de proteine, au arătat Geshelin și Berns (1974), deși electroforetic din virus s-au putut rezolva doar 84—111 polipeptide virale (Sarov și Joklik, 1970 ; Oie și Ishihashi, 1981 ; Essani și Dales, 1979). Studiile efectuate de diverși autori, printre care Garon și colab. (1978), au arătat că fiecare capăt al ADN constă din repetarea inversată a circa 10 000 de perechi de baze. În molecula ADN există, așezate în tandem, zone care codifică proteine și zone care nu codifică (Cooper și colab., 1981 ; Wittek și Moss, 1980). Restul de 90% din genom este unic (Geshlin și Berns, 1974). Datele relativ recente ale lui Soloski și Holowczak (1981) sugerează că ADN viral este asociat cu proteine bazice și cu poliamine, formînd unități condensate de ADN, întrepătrunse de regiuni relaxate, similar nucleozomilor existenți în celulele eucariote ; este posibil ca proteinele bazice să neutralizeze sarcinile negative ale ADN, permițînd formarea acestor structuri cu aspect globular.

Ciclul de replicare. În general, datele asupra multiplicării poxvirusurilor provin din studiile efectuate asupra virusului vaccinal, care are timpi relativ rapizi de replicare. Perioada de eclipsă durează, în acest caz, trei-patru ore, după care urmează replicarea virusului, cu atingerea unui maxim după circa 20 de ore. Sinteza ADN începe la scurtă vreme după infecție, atingînd valoarea maximă trei-patru ore mai tîrziu. În cazul poxvirusului tumoral Yaba însă, maximum de sinteză a ADN se înregistrează abia la 20 de ore de la infecție, iar virusul infectant apare după 30—40 de ore, cu un maximum de titru la 70—80 de ore (Yohn și colab., 1970).

Inițierea infecției. Infecția cu poxvirusuri începe prin atașarea particulelor virale la membranele celulare, printr-o legare a proteinelor virale de receptorii celulari. Hemaglutinina virală și poate și o altă glicoproteină prezentă pe suprafața virusului extracelular par să faciliteze atașarea și/sau pătrunderea, întrucît s-a observat că particulele virale extracelulare pătrund în celule mult mai repede decît particulele virale fără membrană exterioară (Payne și Norby, 1978).

Pătrunderea poxvirusurilor se face fie prin adsorbție nespecifică (viropexie), fie — mai rar — prin fuziune (Dales și Kajioka, 1964 ; Chang și Metz, 1976). În acest din urmă caz intervine legarea poxvirusurilor la membrana celulară prin intermediul structurilor tubulare, ele însele active în fuzionare sau reglatoare ale fuziunii. În cazul viropexiei, particulele virale sînt prinse în vacuole, care apoi se asociază lizozomilor. Enzimele lizozomale îndepărtează învelișul și corpii laterali, cu eliberarea miezului, care se destinde, pierzînd aspectul reniform, de pișcot. În cursul pătrunderii prin fuziune, învelișul extern al particulei virale se lipește la membrana citoplasmatică, eliberînd apoi miezul destins direct în citoplasmă. Decapsidarea urmează astfel două etape : una nespecifică, de conversie a virionului la un nucleoid central, și apoi una specifică, în care nucleoidul se rupe sub acțiunea enzimelor specific virale și/sau a unor enzime celulare derepresate după infecție, astfel încît genomul viral se varsă în citoplasmă.

Evenimentele timpurii de transcriere și traducere. Cunoașterea secvenței evenimentelor de transcriere și traducere în infecția cu poxvirusuri s-a acumulat pe baza utilizări diverșilor inhibitori ai etapelor de replicare virală și este sumarizată în fig. 6-13.

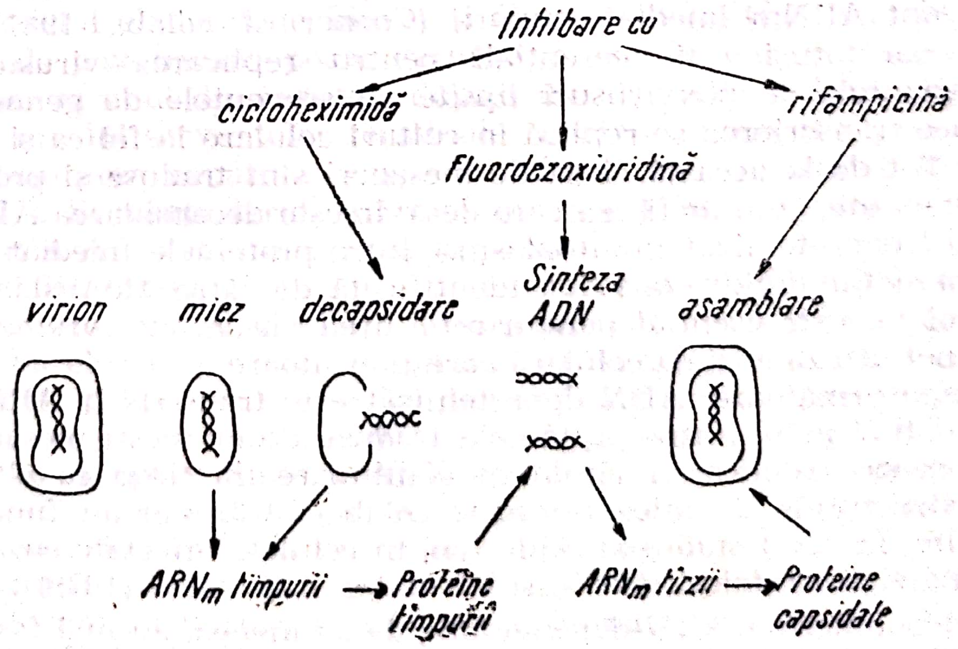


Fig. 6-13 — **Diagrama secvenței evenimentelor la multiplicarea virusului vaccinal (după Fenner și colab., 1974).**

În etapele timpurii — imediată și decalată — se transcrie 40—50% din lungimea genomului. Sistemele de transcriere ale poxvirusurilor sînt aproape integral autonome.

Sediul replicării poxvirusurilor este citoplasma, caracteristică ce le distinge de celelalte virusuri ADN (Prescott și colab., 1971). Pentru ca replicarea să decurgă fără ajutorul enzimelor nucleare, poxvirusurile prezintă un anumit mod de aranjare a proteinelor enzimatice proprii în miezul viral. Marea cantitatea de ADN viral este suficientă pentru a codifica diverse enzime, necesare diferitelor faze ale replicării.

După prima etapă a decapsidării, enzimele miezului viral destins sînt activate și permit desfășurarea transcrierii controlate de pe ADN parental (Pelhm și colab., 1978 ; Venkatesan și Moss, 1981). Întrucît ARNm timpurii transcriși de pe genomul poxvirusurilor prezintă unele caracteristici care îi fac asemănători celor din celulele eucariote, transcrierea timpurie reclamă unele activități enzimatice cu funcții similare cu cele ale partenerilor eucarioți. În miezul viral sînt localizate o serie de enzime, între care se menționează ARN polimeraza ADN-dependentă (Kates și McAuslan, 1976), enzime necesare pentru adăugarea la capătul 5′ al ARNm a structurii „cap“ (guaniltransferaza, ribozo-2-metiltransferaza) (Wei și Moss, 1975 ; Ensinger și colab., 1975), poliA polimeraza necesară formării capătului 3′-poliadenilat al ARNm (Kates și Beeson, 1970 ; Nevins și Joklik, 1975) etc.

ARN, transcriși inițial în interiorul miezului, servesc drept precursori pentru ARNm și moleculele lor sînt scurtate prin îndepărtarea unui segment ribonucleotidic de către o endoribonuclează ATP-dependentă, evidențiată de lucrările lui Paoletti (1977) și Paoletti și Lipinskas (1978). Terminația 5′ capătă structură „cap“, capătul 3′ se poliadenilează, iar ARN complet modificat, denumit ARN imediat-timpuriu, este eliberat de miez în citoplasmă.

Dintr-o regiune anumită, adiacentă repetărilor inverse terminale, se transcriu opt ARNm imediat-timpurii (Cooper și colab., 1981), dintre care unii par totuși a fi neesențiali pentru replicarea virusului, cîtă vreme variantele de poxvirusuri lipsite de secvențele de genom de pe care se face transcrierea se replică în culturi celulare la fel ca și tulpinile sălbatice. Tot de la această clasă de mesageri sînt traduse și proteine cu funcții cunoscute, cum ar fi cea care desăvîrșește decapsidarea ADN viral, eliberîndu-l deproteinizat în citoplasmă. Între proteinele imediat-timpurii se numără și timidinkinaza (TK), identificată de către McAuslan (1963), al cărei rol nu este esențial pentru replicarea virală, cîtă vreme mutantele TK^- pot utiliza enzima celulară corespunzătoare.

În etapa următoare, ADN deproteinizat este transcris la ARNm timpurii decalați. Unele dintre proteinele traduse de la acești mesageri sînt esențiale pentru replicarea virală în continuare, în timp ce altele sînt proteine structurale de miez (Moss și colab., 1973) sau au funcții încă necunoscute. În acest stadiu al replicării, în celulele infectate cu poxvirusuri, Youngwirth și Joklik (1965) și Chalberg și England (1979) au detectat o ADN polimerază ADN-dependentă; de asemenea, au mai fost detectate o polinucleotidkinază (Sambrook și Shatkin, 1969), precum și două DNaze cu pH optim de activitate diferit (McAuslan și Kates, 1966 ;

Rosemond-Hornbeak și Moss, 1974). Toate aceste enzime îndeplinesc diverse roluri în sinteza ADN.

Un fapt cu totul deosebit în ceea ce privește poxvirusurile este apariția în fazele timpurii a unor proteine structurale ale miezului viral, precum și a altor proteine, componente de suprafață (Holowczak și Joklik, 1967).

Replicarea ADN. Sinteza ADN începe la 1—2 ore după infecție. ADN viral, în asociere cu unele proteine virale fosforilate, formează niște structuri bine definite, denumite *virozomi* (Dahl și Kates, 1970 ; Polisky și Kates, 1972 ; Sarov și Joklik, 1972) și localizate în anumite zone ale citoplasmei, lipsite de organite celulare (Cairns, 1960).

Mecanismul replicării ADN din virusurile pox nu a fost încă pe deplin elucidat, dar — pe baza observațiilor experimentale cu privire la caracteristicile structurale ale ADN viral și a speciilor de intermediari de replicare, identificați în celulele infectate — s-au propus două modele (Esteban și colab., 1977 ; Moyer și Graves, 1981) (fig. 6-14).

În modelul descris de către Esteban și colab. (1977) (fig. 6-14 *a*), sinteza ADN este inițiată la unul din capetele ADN parental legat încrucișat la capete *(cross-linked)* de către un ARN-amorsă, care, la rîndul său, a fost sintetizat de către o ARN polimerază ADN-dependentă virală. Sinteza discontinuă a ADN dă naștere la cîteva segmente de ADN, care după îndepărtarea amorselor suferă procesul de ligare. În acest mod, sinteza continuă pînă cînd sînt replicate ambele catene parentale. La ambele capete ale ADN parental se produce cîte o crestătură, ceea ce dă naștere la două duplexuri liniare identice. Capetele acestora sînt apoi pliate ; aceste noi structuri servesc drept amorsă pentru completarea lipsurilor din catenele ADN, întrucît pe fiecare catenă cîte o secvență terminală este incompletă, iar capătul corespunzător al catenei complementare servește drept matriță. În final, capetele ADN se leagă încrucișat, formînd astfel genomul progen complet.

În modelul elaborat de Moyer și Graves (1981) (fig. 6-14 *b*), replicarea ADN de poxvirusuri poate decurge și cu formare de concatemeri. Inițial, doar la unul din capetele duplexului de ADN se introduce o crestătură, la nivelul secvențelor terminale repetate invers B′C′, ceea ce permite desfășurarea capătului respectiv, după cum au arătat studiile lui Pogo (1977). Secvența terminală mai lungă (L) (cf. engl. *long* = lung) cu regiunea B′A′AB servește ca matriță pentru elongarea secvenței terminale de pe cealaltă catenă (L′) cu C′ ca amorsă. Sinteza de ADN continuă și după ce secvențele BA se pliază asupra secvențelor A′B′, cu complementarizarea bazelor respective. Structura „în ac-de-păr“ formată servește și ea ca amorsă pentru sinteza ADN nascent și, pe măsură ce se desfășoară, se deplasează și cele două catene ale ADN parental (LR și L′R′) [cf. engl. *right* (R) = dreapta]. Sinteza ADN continuă, iar catenele progene complete servesc drept matriță etc. Acest proces continuă și el, apărînd forme concatemere, care constau din două unități de lungime de ADN viral parental plus cîteva unități de lungime corespunzător ADN progen format *de novo*. Ulterior, concatemerii formați prin acest proces sînt scindați la ADN dublu-catenar, care apoi este încorporat în particulele virale.

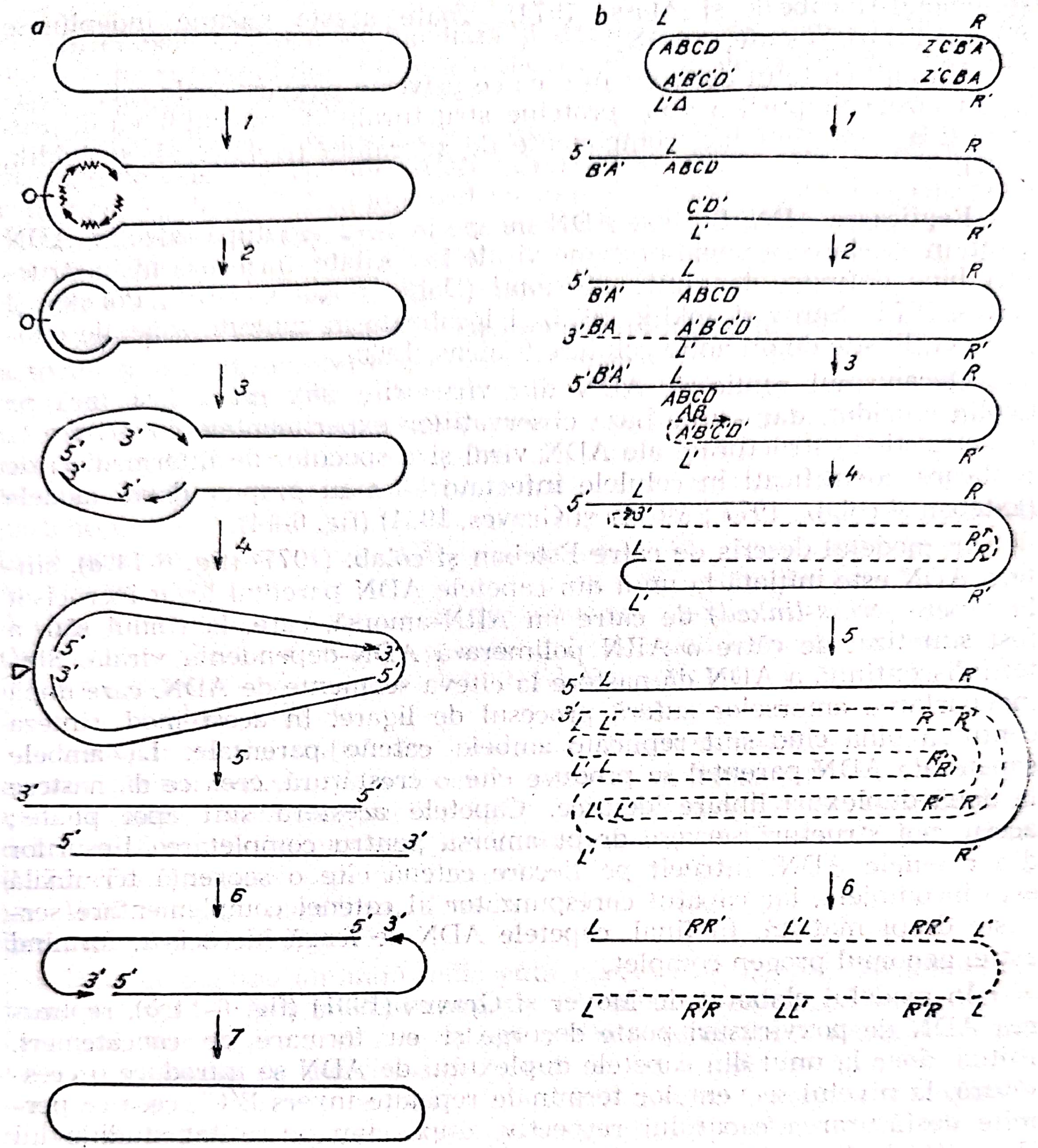


Fig. 6-14 — Două modele de replicare a ADN de poxvirusuri (detalii în text). *a* — după Esteban și colab (1977) ; *b* — după Moyer și Graves (1981).

Evenimentele tîrzii de transcriere și replicare. După inițierea sintezei ADN, de pe moleculele progene se transcriu mesagerii tîrzii, care apoi sînt traduși la proteine tîrzii ; majoritatea acestora o formează proteinele structurale (Salzman și Sebring, 1967).

Tot în cursul evenimentelor tîrzii sînt sintetizate și unele din enzimele miezului viral, precum și unele proteine cu rol reglator în sinteza mesagerilor timpurii. În general, ARNm tîrzii sînt relativ instabili, cu o semiviață de circa 15 minute, comparativ cu timpul de semiviață al ARNm timpurii, care atinge 120 de minute (Sebring și Salzman, 1967), deși alte studii au arătat că între cele două specii nu ar exista diferențe (Oda și Joklik, 1967).

S-ar părea că transcrierea ARNm tîrzii în cazul poxvirusurilor este dependentă de prezența argininei (Obert și colab., 1971), fapt întîlnit de altfel și la adenovirusuri și la herpesvirusuri, a căror multiplicare este inhibată de deficiența în arginină. S-a observat — la poxvirusuri — că în absența argininei au loc și transcrierea și traducerea ARNm timpurii, precum și replicarea ADN. S-ar putea ca acest aminoacid să fie necesar fie sintezei proteinei unei noi polimeraze (necesară transcrierii tîrzii), fie sintezei unei proteine transcrise de pe ARNm timpurii, dar care intervine eventual în menținerea ADN progen într-o anumită stare fizică, apropriată inițierii transcrierii tîrzii.

Trebuie menționat că transcrierea celor trei clase de ARNm — imediat-timpurii, timpurii-decalați și tîrzii — este strict reglată în cursul infecției. Dacă în fazele timpurii se traduc 40—50% din genom, în stadiile tîrzii transcrierea ARN se face 100% (Oda și Joklik, 1967 ; Kaverin și colab., 1975 ; Paoletti și Grady, 1977). Dacă se face aprecierea cantitativă a mesagerilor specifici, se pot deosebi diferențe ; de exemplu, unele gene intens transcrise în stadiile timpurii sînt mai puțin transcrise în stadiile tîrzii (Cabrera și colab., 1978).

Dată fiind complexitatea poxvirusurilor și neprecizarea, pînă în acest moment, a numărului proteinelor lor structurale, deocamdată nu se cunosc în amănunțime numeroase aspecte ale evenimentelor tîrzii din ciclul de replicare virală.

Asamblarea poxvirusurilor și eliberarea lor. Morfogeneza poxvirusurilor decurge ca o secvență de evenimente ordonate. Deja după circa trei ore de la infecție se observă, la microscopia electronică, formarea *de novo* a învelișurilor, prin combinarea unor lipide celulare modificate de virus sau a unor lipide provenite din structuri membranare (diferite de membrana plasmatică) cu proteinele virale și apariția unor arcuri acoperite de proiecții sau „spiculi“ (Dales și Mosbach, 1968). „Spiculii“ acționează ca un cadru, ceea ce ajută la determinarea dimensiunilor particulelor virale. Acest mecanism diferă de cel al altor virusuri cu înveliș, a căror compoziție lipidică este asemănătoare celei a membranei plasmatice ; de exemplu, un fosfolipid major din învelișul poxvirusurilor apare predominant în membrana lizozomilor (Hiller și colab., 1981).

Uneori, ADN progen și un anumit număr de proteine virale sînt încorporate în particulele virale imature, înainte ca învelirea să fie total terminată.

Rearanjamentele conformaționale ale ADN și ale proteinelor virale dau naștere structurii interne a miezului, la care se adaugă apoi corpii laterali. Un proces critic în această etapă îl constituie ruperea proteolitică a unor proteine precursoare, în scopul formării unora din proteinele miezului (Silver și Dales, 1982). S-ar părea că direct răspunzătoare de aceste ruperi ar fi niște proteaze virale cu viață scurtă, încorporate particulei virale.

De asemenea, se modifică și suprafața externă a învelișului viral, cu rearanjarea „spiculilor“ și înlocuirea lor cu elementele tubulare de suprafață specifice poxvirusurilor, aranjate pe suprafața dublului strat lipidic și formate dintr-un polipeptid cu masa moleculară de 58 000 daltoni, după cum a reieșit din determinările lui Mitchiner (1969) și Medzon și Bauer (1970).

Un mic procent din virusul intracelular dobîndește o membrană suplimentară prin înmugurire prin structurile membranare ale aparatului Golgi (Payne și Kristensson, 1982). Aceste particule, dublu-membranare, migrează spre suprafața celulei, unde are loc fuziunea dintre membranele de origine intracelulară ale virusului și membranele citoplasmatice. Deci, virusul extracelular are două membrane, una derivînd de la aparatul Golgi și una care învelește miezul și corpii laterali.

În particulele virale extracelulare învelite se află și o hemaglutinină de origine virală.

Alterarea metabolismului celular. Foarte devreme în cursul infecției cu poxvirusuri, activitățile metabolice celulare normale suferă un declin. La 1—2 ore după infecție se înregistrează practic aproape numai sinteză proteică virală.

Cercetări relativ recente, întreprinse de Mbuy și colab. (1982), sugerează că proteina care constituie tubulii de suprafață de pe particula virală, poate, ea singură, să inhibe sinteza proteinelor celulare, ceea ce duce ulterior la inhibarea altor evenimente sintetice celulare. De asemenea, ADN celular nou-sintetizat poate fi degradat de către nucleazele virale (Des Gouttes-Olgiatti și colab., 1976 ; Pogo și Dales, 1974).

6.3. REPLICAREA VIRUSURILOR CU GENOM ARN

Virusurile ARN prezintă niște particularități unice între sistemele genetice ; chiar în interiorul acestui grup mare de virusuri există diferențe în ceea ce privește mecanismul de realizare a proceselor de transcriere, traducere și replicare. Comparativ cu virusurile ADN, virusurile ARN au o informație genetică relativ limitată, ele codificînd un număr mic de enzime, dintre care nu lipsește cel puțin o ARN polimerază ARN-dependentă. În general, cele mai multe virusuri cu genom ARN se maturează prin înmugurire din membrana citoplasmatică.

În linii mari, ciclul de replicare a virusurilor ARN urmează etape asemănătoare celor de la replicarea virusurilor ADN, dar apar și unele diferențieri fundamentale. Replicarea virusurilor ARN cuprinde transcrierea ARN (adică producerea unor mesaje specific virale), replicarea ARN (adică sinteza genomurilor virale) și traducerea ARNm (adică sinteza și prelucrarea proteinelor virale). Se cunosc mai multe genuri de virusuri ARN decît de virusuri ADN. Ciclurile de multiplicare ale diferitelor virusuri ARN variază substanțial în ceea ce privește durata diverselor etape, precum și din alte puncte de vedere, cum ar fi randamentul de virus produs.

Trebuie menționat de la bun început că ARN extras dintr-un virus este infectant numai dacă :

— genomul său nu este format din fragmente ;

— virionul de proveniență nu are inclusă o transcriptază proprie, denumită *replicază*. Această cerință este o reflectare a polarității ARN viral, deoarece replicaza este necesară doar atunci cind genomul constituie un „antimesaj“, astfel incit inaintea traducerii la proteine este necesară transcrierea unui ARNm complementar. In acest context, reverstranscrierea reprezintă un caz aparte, care va fi tratat independent.

Virusurile ARN și-au dobîndit pe parcursul evoluției diverse căi de răspuns la problema modului de producere a unui anumit număr de proteine dintr-un singur set de informație genetică, aparatul de biosinteză a proteinelor din celulele animale părind să nu aibă capacitatea de inițiere a traducerii unor cistroni individuali de-a lungul unui ARNm cu caracter policistronic.

Replicarea ARN viral este un proces unic și specific virusurilor ARN ; virusurile cu genom monocatenar se replică printr-un proces semiconservativ, în care moleculele de ARN viral parental servesc drept matriță pentru transcrierea simultană a cîtorva catene de ARN complementar, după cum au arătat, printre alții, Spiegelman și colab. (1968) și Weissman și colab. (1968). Intermediarul de replicare (FRI) este o structură parțial dublu-catenară, cu cozi monocatenare. Moleculele monocatenare de ARN complementar matriției se desprind și, la rîndul lor, servesc ca matrițe pentru sinteza unor molecule de ARN viral. ARN polimerazele ARN-dependente codificate de virus — replicazele — catalizează acest proces, ele fiind specifice fiecărui ARN din fiecare specie virală. Mai mult chiar, uneori, pentru producerea catenelor „—“ și „+“ sînt necesare enzime diferite.

Traducerea proteinelor virale are loc mai ales la poliribozomii asociați mebranelor reticulului endoplasmatic. Glicozilarea unora din proteinele virale are loc la nivelul membranelor celulare netede, iar replicarea ARN se produce la „complexul de replicare“ legat de membrane.

În multiplicarea virusurilor ARN membranele celulare joacă un rol important, pe de o parte fiind implicate în atașarea particulelor virale, iar pe de altă parte — în asamblarea și eliberarea particulelor virale, care are loc prin înmugurire, urmînd secvența de evenimente de mai jos :

— glicoproteinele virale pătrund în membrana plasmatică, deplasînd unele proteine celulare ;

— „proteinele de membrană“ virale, cu moleculă mică, neglicozilată, formează un strat pe partea interioară a membranei plasmatice ;

— nucleocapsida virală se atașează membranei, iar glicoproteinele virale se desfășoară sub forma unor proiecții vizibile pe partea din afară a membranei plasmatice ;

— ciclul de multiplicare se încheie cu înmugurirea virusului, ca revers al procesului de citoliză, și cu eliberarea noilor virioni.

Din punct de vedere al strategiei lor de replicare, virusurile care conțin un genom ARN monocatenar se subdivid în două mari categorii : virusuri cu catenă ARN pozitivă și virusuri cu ARN cu catenă negativă. La virusurile cu ARN „+“ infecția este inițiată odată cu traducerea ARN parental, în scopul producerii replicazelor/transcriptazelor virale. Acest complex enzimatic sintetizează catena „—“ cu rol de matriță, apoi catena „+“ progenă pe matrița „—“ anterioară, precum și unele mesaje subgenomice „+“ pentru unele polipeptide virale structurale și/sau nestructurale. Virusurile cu catenă „—“ conțin replicaza/transcriptaza ca parte componentă a virionului, introducînd-o ca atare în celula-gazdă ; în acest caz, evenimentul inițial în replicarea virală va consta în transcrierea primară a ARN din nucleocapsidă, pentru producerea mesajelor specifice tuturor proteinelor codificate de către virus. În continuare, are loc sinteza catenei complementare „+“ (antigenomul), sinteza catenei „—“ genomice și transcrierea secundară.

Strategiile de replicare pentru fiecare grup de virusuri în parte au o anumită ordine de desfășurare a evenimentelor postinfecție. Astfel, în picornavirusuri, ARN viral monocatenar are și rol de mesager, el fiind tradus la un polipeptid unic ; în acest caz nu are loc un control special al transcrierii sau traducerii. La virusurile care conțin o transcriptază structurală și care sintetizează ARN mesageri monocistronici complementari ARN viral, s-a constatat că diversele gene sînt transcrise cu viteze diferite, iar proteinele virale nu sînt sintetizate echimolecular, numărul lor fiind — cel puțin aparent — invers proporțional cu masa moleculară. Se înregistrează chiar și unele fluctuații ale vitezei de sinteză, în funcție de desfășurarea ciclului de replicare virală ; există și mecanisme de reglare care determină dacă într-o anumită fază a ciclului de replicare virală moleculele de ARN mesager vor fi folosite pentru traducerea la proteine sau ca antigenom pentru replicarea ARN sau — în cazul ARN viral cu rol mesager — direct pentru asamblarea în virion.

La virusurile ARN ale mamiferelor s-a observat că în cursul transcrierii, și eventual în traducere și replicare, ARN viral rămîne asociat cu unele din proteinele miezului viral, bogate în arginină. În plus, transcriptaza virală pare să fie activă atunci cînd este asociată nucleocapsidei. În alte cazuri, cum ar fi în infecția cu virus gripal, în celule se acumulează o proteină virală nestructurală, cu rol probabil în pregătirea ribozomilor pentru acceptarea și traducerea mesajului viral, în dauna celui celular. De asemenea, determinantă pentru transcrierea genelor timpurii de către transcriptază, direct pe acidul nucleic viral, pare să fie și conformația ARN viral. Strauss și Strauss (1983) presupun că reglarea temporală și cantitativă a transcrierii față de replicare și cea a sintezei genomului față de cea a sintezei antigenomului ar putea rezida în specificitatea de inițiere și că anumite secvențe nucleotidice sînt recunoscute specific de către replicazele/transcriptazele virale ; ar putea exista două tipuri posibile de semnale de recunoaștere :

— o secvență de 10—20 de nucleotide, cu un înalt grad de conservare în cadrul unui grup de virusuri înrudite și ale cărei nucleotide, așezate într-o ordine precisă, pot fi ușor identificate de către enzimele virale ;

— o structură secundară de circa 200 de nucleotide, stabilizată prin punți de hidrogen, și în care enzimele recunosc conformația și nu secvența. În acest caz, în cadrul unui grup de virusuri înrudite se conservă structura secundară, chiar dacă structura primară s-a modificat.

Deci, în cazul virusurilor cu catenă ARN „+“, ARN infectant este tradus în vederea sintezei unei replicaze virale, care apoi copiază ARN parental pentru a da naștere catenei „—“, care, ulterior, servește drept matriță pentru sinteza catenei „+“. Succesiunea de reacții ARN „+“ → ARN „—“ → ARN „+“ constituie replicarea ARN, implicînd replicazele virale. Producerea fragmentelor subgenomice de ARN constituie transcrierea, enzimele participante fiind desemnate ca transcriptaze.

Diferențele cele mai evidente în ceea ce privește replicarea virusurilor care conțin ARN „+“ rezidă în mecanismele pe care ele le folosesc pentru producerea și traducerea ARNm corespunzători și care variază destul de mult între ele.

La rîndul lor, virusurile cu catenă ARN „—“ se subîmpart în virusuri al căror genom este reprezentat de o moleculă unică, continuă (cum sînt rhabdovirusurile și paramyxovirusurile) și virusuri al căror genom este segmentat (arenavirusuri — două segmente ; bunyavirusuri — trei segmente ; orthomyxovirusuri — opt segmente). ARN deproteinizați izolați din virusurile cu catenă ARN „—“, unică sau segmentată, nu pot funcționa în celulele infectate ca ARNm, deci nu au caracter infectant. Aceste cinci familii virale sînt relativ înrudite între ele ; toate conțin o nucleocapsidă cu simetrie helicoidală, înconjurată de un strat lipoproteic dobîndit prin înmugurire din celula-gazdă. Infecția se datorează, în acest caz, pătrunderii în celulă a nucleocapsidei care conține inclusiv replicaza/transcriptaza. Prin transcrierea primară a ARN viral din nucleocapsida infectantă se produc primele molecule de ARNm, cu un caracter în general monocistronic, cu structuri $5'$-m^7GppA^mp și $3'$-poliadenilați. Traducerea acestor ARNm are ca efect apariția unor proteine virale, unele cu activitate polimerazică, ceea ce conduce la amplificarea transcrierii secundare. Concomitent se desfășoară și sinteza antigenomului, cu rol de matriță. În general, ARN antigenomic nu este identic cu ARNm.

La capetele $3'$ și $5'$ ale genomului sau fragmentelor de genom cu polaritate negativă există secvențe de 11—21 de nucleotide care se autocomplementarizează și care par necesare atît încapsidării genomului și antigenomului, cît și pentru a servi ca semnale de recunoaștere pentru inițierea transcrierii și replicării. Deși catena „+“ este și ea încapsidată, se regăsește rareori în virionii maturi.

În cursul replicării tuturor grupelor de virusuri cu ARN „—“ se produce mai mult genom decît antigenom, iar replicazele sintetizează diferențiat cele două tipuri de catene.

Efectuarea unor pasaje succesive de virus la o multiplicitate mare de infecție duce la acumularea în celule a unor particule virale defective sau incomplete. Prima oară, fenomenul a fost semnalat de către von Magnus (1954) pentru virusurile gripale, dar, ulterior, a fost identificat la aproape toate virusurile animale studiate (Huang și Baltimore, 1977 ; Perrault, 1981). În general, particulele virale defective prezintă unele caracteristici comune :

— lipsa a 10—90% din genomul standard pentru virusurile respective ;

— imposibilitatea replicării independente și necesitatea prezenței unui virus ajutător (virus standard). Cel mai adesea, genomul virusurilor defective nici nu se transcrie, nici nu se replică ;

— existența aceluiași set de proteine virale ca și în virusul standard ;

— virusurile defective împiedică replicarea virusului standard omolog, ceea ce are drept efect reducerea randamentului de virioni infectanţi ;

— prin pasaje succesive se poate ajunge la creşterea randamentului de virioni infectanţi (preparatele se „îmbogăţesc“).

6.3.1. REPLICAREA PICORNAVIRUSURILOR

Familia *Picornaviridae* face parte dintre virusurile animale cu catenă ARN „+“ nesegmentată şi conţine virioni fără înveliş, avînd simetrie icosaedrică şi un diametru de 22—30 nm. ARN genomic are o masă moleculară de $2,5 \times 10^6$ daltoni (Granboulan şi Girard, 1969 ; Tannock şi colab., 1970), conţinînd circa 7 500 de nucleotide. Caracteristic pentru ARN al picornavirusurilor este legarea covalentă a unui polipeptid la capătul 5′, în timp ce la capătul 3′ este poliadenilat, avînd 80—120 de resturi de adenină. Capsida virală conţine circa 60 de copii ale fiecăreia din cele patru polipeptide virale specifice, desemnate VP1, VP2 şi VP3 (cu masa moleculară de 23—37 000 daltoni, în funcţie de tipul de virus) şi VP4 (cu masa moleculară de 9—15 000 daltoni) (Rekosh, 1977 ; Matthews, 1982).

Pe baza diferenţelor în ceea ce priveşte densitatea de plutire în gradient de CsCl, Mathews (1982) a propus împărţirea picornavirusurilor în patru genuri :

— enterovirusuri ;

— cardiovirusuri ;

— rhinovirusuri ;

— aphtovirusuri,

toate patogene pentru mamifere, iar entero- şi rhinovirusurile conţinînd şi membri patogeni pentru om.

Datele cunoscute la ora actuală asupra replicării picornavirusurilor s-au obţinut în special din studiile întreprinse asupra virusului polio de tip 1, din genul *Enterovirus*.

Ciclul de replicare. Virusul polio se multiplică rapid atît în linii celulare umane, cît şi simiene, după 4—5 ore de la infecţie, obţinîndu-se randamente mari de virus progen. Întregul ciclu de replicare se desfăşoară în citoplasmă, după cum au precizat Franklin şi Baltimore (1962), unde are loc sinteza ARN şi a proteinelor, ca şi asamblarea virionului, în strînsă asociere cu membranele (Mosser şi colab., 1972).

Iniţierea infecţiei. Replicarea virusului polio are loc în celule umane sau simiene, deoarece pe suprafaţa lor se găsesc receptori specifici pe care se adsoarbe acest virus. De altfel, polipeptidul-receptor a putut fi izolat din membranele plasmatice ale celulelor susceptibile. Celulele nesusceptibile au fost totuşi infectate cu ARN viral purificat. Decapsidarea acidului nucleic începe chiar în timp ce virionul adsorbit se află în afara celulei ; prima proteină care se desprinde este VP4. Traversarea membranei se produce prin viropexie.

Traducerea. În urma studiilor lui Kitamura şi colab. (1981) şi Racaniello şi Baltimore (1981), astăzi se cunoaşte în întregime secvenţa genomului virusului polio, ceea ce a permis clarificarea procesului de traducere a informației, precum și înțelegerea *processing*-ului pe care îl suferă produsele virale. Pe baza datelor de structură primară s-a putut elabora și harta organizării genomului.

ARN de poliovirus 1, tulpina Mahoney, conține 7 433 de nucleotide; traducerea ARN începe la un codon AUG aflat la o depărtare de 741 de nucleotide de capătul 5′ și continuă pe parcursul a 6 621 de nucleotide, pînă ajunge la codonul de terminare UAG, aflat la 72 de nucleotide de capătul 3′-poliadenilat. Prin traducerea integrală a mesajului rezultă un precursor proteic de 2 207 amnioacizi, care este organizat în trei regiuni, după cum urmează:

— regiunea —NH_2-terminală conține secvențele celor patru proteine virale structurale VP1, VP2, VP3 și VP4;

— regiunea centrală conține secvențele unor proteine virale cu funcție necunoscută;

— regiunea —COOH-terminală conține secvențele necesare atît pentru replicaza virală, cît și pentru proteazele responsabile de majoritatea (sau chiar toate) prelucrările pe care le suferă poliproteina virală.

Rueckert și colab. (1979) au arătat că în poliproteina-precursor se petrec minimum 10 ruperi, din care opt la legături Gln-Gly (Semler și colab., 1981; Larsen și colab., 1982) și sînt indiscutabil produse de o protează codificată de virus, activă ca polipeptid, cu masa moleculară de 22 000 daltoni (pentru realizarea proteinelor capsidale individuale) sau ca polipeptid-precursor (în *processing*-ul precursorilor replicazei virale) (Palmenberg și Rueckert, 1982). Majoritatea acestor ruperi au loc destul de lent, în cursul a 15—20 minute.

În fig. 6-15 este prezentată traducerea ARN din virusul polio. Primele două ruperi în *processing*-ul poliproteinei, care are o masă moleculară de circa 250 000 daltoni, decurg cu o viteză foarte mare, chiar pe pro-

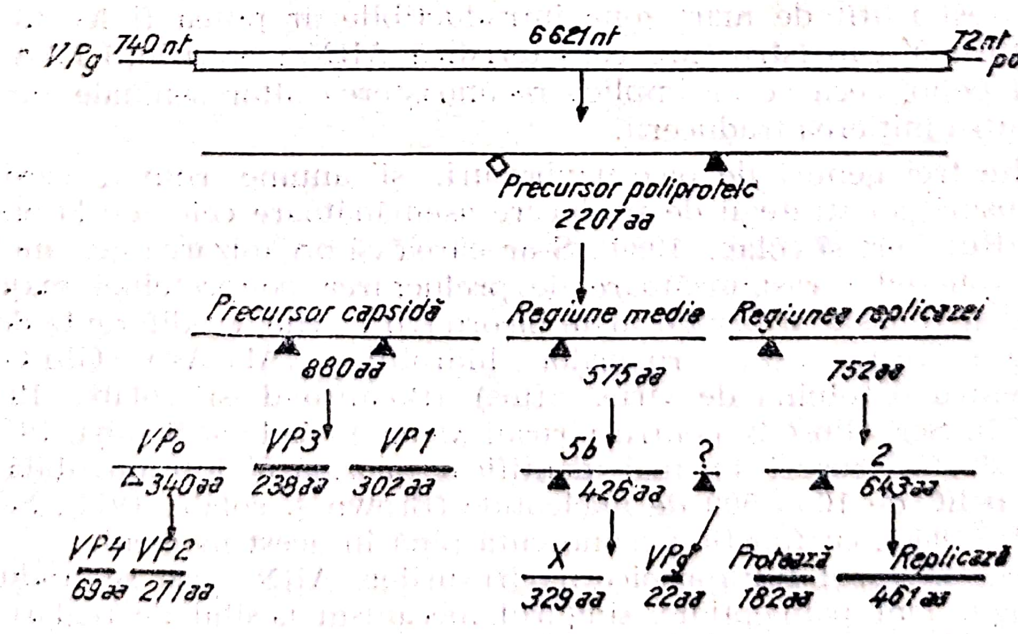

VPg
740 nt
6 621 nt
72 nt
poli A 3′
Precursor poliproteic
2207 aa
Precursor capsidă
880 aa
Regiune medie
575 aa
Regiunea replicazei
752 aa
VP₀
340 aa
VP3
238 aa
VP1
302 aa
5b
426 aa
?
2
643 aa
VP4
69 aa
VP2
271 aa
X
329 aa
VPg
22 aa
Protează
182 aa
Replicază
461 aa

Fig. 6-15 — Traducerea ARN din virusul polio tulpina Mahoney.
▲ — hidroliza Gln-Gly; △ — hidroliza Asn-Ser; ◇ — hidroliza Tyr-Gly (după Racaniello și Baltimore, 1981; Strauss și Strauss, 1983).

dusul nascent, după cum a reieșit din cercetările lui Korant (1979) sau Lucas-Lenard (1979). Prin utilizarea unor analogi ai aminoacizilor sau în prezența unor inhibitori ai proteazelor s-a putut acumula în celulele infectate poliproteina ca atare. Prima rupere a poliproteinei, în urma căreia se separă precursorul polipeptidului capsidei, are loc la o legătură Tyr-Gly, sub acțiunea unei enzime cu activitate chimotriptică (Semler și colab., 1981). Această enzimă, a cărei acțiune este calitativ diferită prin specificitate și cinetică de următoarele, ar putea fi de origine celulară (Korant, 1972) sau de origine virală, fiind de fapt reprezentată de însăși regiunea —COOH-terminală a proteinei nucleocapsidei. A doua ipoteză este cea mai probabilă.

A doua rupere, în urma căreia se separă regiunea medie a precursorului de capătul —COOH, are loc la perechea Gln-Gly (Semler și colab., 1981) și este catalizată de o protează virală cu această specificitate.

În continuare se mai realizează încă șapte ruperi la perechi de aminoacizi Gln-Gly. A opta rupere, ultima care se mai înregistrează, are loc la o legătură Asn-Ser (Larsen și colab., 1982) și coincide cu atașarea ARN la procapsidă, în vederea formării virionului matur (Rueckert, 1976). S-ar putea ca la hidroliza acestei perechi de aminoacizi, asemănătoare cu Gln-Gly, să acționeze aceeași enzimă, dar, avînd o afinitate mai mică pentru acest substrat, să apară un decalaj între punerea în evidență a proteinelor respective, ca produse finale de reacție.

În celulele infectate cu virus polio s-au identificat numeroși intermediari, cu intervale de semiviață foarte diferite, ceea ce, deocamdată, face destul de dificilă descifrarea completă a schemei de prelucrare a precursorului proteic.

În plus, segmentul de 740 de nucleotide, care precedă codonul de start al poliproteinei majore este deosebit de lung pentru o zonă intraductibilă 5′, ceea ce sugerează că el ar putea totuși codifica una-două polipeptide mici, neevidențiate pînă în acest moment. O altă explicație a existenței acestei atît de mari zone intraductibile ar putea fi legată de lipsa structurii 5′-cap (structură caracteristică ARNm eucarioți) la ARN din virusul polio, ceea ce ar implica recunoașterea altor semnale caracteristice pentru inițierea traducerii.

Celelalte trei genuri de picornavirusuri, și anume rhino-, cardio- și aphtovirusuri, au strategii de traducere asemănătoare celor de la enterovirusuri (Rueckert și colab., 1980). S-ar părea că organizarea genomului și natura proteazelor răspunzătoare de prelucrarea poliproteinei majore precursoare ar fi aceleași pentru toate picornavirusurile, cu diferențe doar în ceea ce privește sediul ruperilor hidrolitice (Ala-Asp, Glu-Gly, Gln-Thr pentru o tulpină de virus aftos) (Boothroyd și colab., 1981) (Ala-Asp, Gln-Ser, Gln-Gly pentru virusul Mengo) (Ziola și Scraba, 1976). La cardio- și aftovirusuri s-a mai identificat în zona 5′ intraductibilă și o secvență poliC de 100—500 de nucleotide (Brown și colab., 1974 ; Sangar și colab., 1980), cu funcție necunoscută pînă în acest moment.

Deoarece în cazul tuturor picornavirusurilor, ARN viral se traduce într-un singur lanț polipeptidic, singurul mecanism posibil de reglare a cantității relative de proteină capsidală față de proteinele nestructurale ar putea consta în terminarea prematură a sintezei proteice, fenomen pus în evidență atît *in vitro* (Ehrenfeld, 1979), cît și *in vivo* (Rueckert, 1976).

Replicarea ARN viral. Picornavirusurile nu produc molecule de ARN de dimensiuni subgenomice, iar replicarea ARN viral reclamă doar două activități enzimatice, reprezentate de o replicază care sintetizează catena „—“ pe întreaga lungime a catenei „+“ ca matriță și o altă replicază care sintetizează catena „+“ pe matrița catenei „—“ (Rekosh, 1977) (fig. 6-16). Întrucît dozările făcute cu izotopi radioactivi au arătat că numărul catenelor „+“ este mult mai mare decît al celor „—“, s-ar putea ca suportul material al celor două activități enzimatice să fie diferit.

Secvența nucleotidică completă se cunoaște doar pentru ARN din virusul polio tip 1, dar secvențele 3′- și 5′-terminale au mai fost determinate și în cazul altor picornavirusuri, cum ar fi : alte două tulpini de virus polio și una de virus Coxsackie (Hewlett și Florkiewicz, 1980) sau trei tulpini de virus polio (Nomoto și colab., 1981) (fig. 6-17). Prin com-

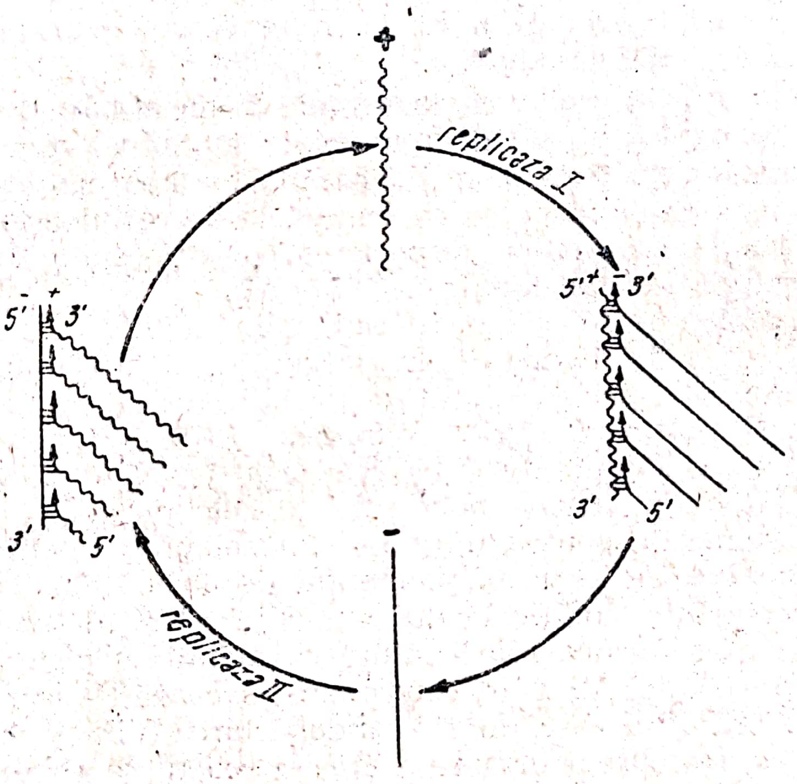


Fig. 6-16 — Replicarea ARN din picornavirusuri.

```
                       3      10        20        30
                       |      |         |         |
polio 1.      5' VPg—UUAAAACGGAGCUCUGGGUUGUACCCACCCGAGAGGCC
polio 2          VPg——A——C    A—U—G——CG
Coxsackie B1     VPg——A——C    A—CUGU——G
                        30        20        10
                         |         |         |
polio 1              UACUGCUGUAGGGGUAAAUUUUUCUUUAAUUCGG-poliA 3'
```

Fig. 6-17 — Secvențele 5′- și 3′-terminale ale unor virusuri polio (enterovirusuri) umane.

Liniile — identitatea nucleotidelor, iar întreruperea s-a făcut pentru aliniere (după Hewlett și Florkiewicz, 1980 ; Nomoto și colab., 1981 ; Strauss și Strauss, 1983).

pararea secvențelor cunoscute s-a observat că primele 10 nucleotide de la capătul 5′ sînt identice la toate virusurile studiate, iar următoarele 10 sînt aproape identice la tulpinile de poliovirusuri, dar cu o conservabilitate de numai 50% la Coxsackie. Harris (1980) a studiat nouă tulpini de aphtovirusuri, găsind conservarea a 27 de nucleotide de la capătul 5′ al catenelor ARN.

Dacă Hewlett și Florkiewicz (1980) au sugerat că înaltul grad de conservare observat ar constitui un semnal de recunoaștere pentru sistemul de traducere al gazdei, Strauss și Strauss (1983) consideră că de fapt este vorba de o structură de recunoaștere a catenei negative de către replicaza virală pentru catena pozitivă. Tot Strauss și Strauss (1983) au arătat că primele 40 de nucleotide din ARN din virusul polio (la fel ca și la ARN din virusul aftos) formează o structură secundară stabilă „în ac-de-păr“, cu un posibil rol în replicare și/sau traducere ; s-ar putea ca secvența bine conservată să fie implicată în replicare, în timp ce structura secundară să intervină în traducere.

Fellner (1979) a constatat că secvențele 3′-terminale ale picornavirusurilor prezintă un înalt grad de conservare în cadrul genurilor, dar nu și între genuri. Zonele terminale 3′ prezintă o slabă omologie cu zonele 5′-terminale, ceea ce ar însemna că semnalele de recunoaștere a inițierii, și deci complexele enzimatice respective, pot diferenția între sintezele pe cele două catene de polaritate inversă ale ARN.

Inițierea replicării ARN din virusul polio implică participarea VPg, un polipeptid cu 22 de resturi de aminoacizi, legat la ultimul reziduu de uracil al capătului 5′, printr-o legătură fosfodiesterică cu un rest de tirozină (Ambros și Baltimore, 1978 ; Wimmer, 1979). Petterson și colab. (1978) au arătat că polipeptidul VPg este legat covalent la toate catenele născînde de ARN din virusul polio, atît la cele negative, cît și la cele pozitive. De asemenea, pentru inițierea sintezei unei catene de ARN de virus polio mai este necesar un polipeptid de 85 000 daltoni sau o versiune a sa prescurtată, codificată de zona 3′ a ARN (desemnată ca zonă a replicazei) și care formează o legătură covalentă cu primul reziduu de uracil, prin intermediul VPg. În continuare urmează — sau are loc concomitent — o hidroliză care duce la îndepărtarea VPg și la reformarea activității proteazice. Drept urmare a acestei reacții se eliberează componenta de 52 000 daltoni a replicazei, care va conduce apoi la elongarea lanțului de ARN inițiat (Palmenberg și colab., 1979).

Din celulele infectate cu virus polio, Flanegan și Baltimore (1979) și Etchinson și Ehrenfeld (1980) au reușit să izoleze o ARN polimerază ARN-dependentă solubilă, cu o masă moleculară de 58—63 000 daltoni. Pentru inițierea sintezei ARN din picornavirusuri, acest preparat purificat — dependent de matriță — reclamă o amorsă oligoU, alături de un factor de gazdă (Dasgupta și colab., 1980).

VPg este îndepărtat din ARN destinat să devină ARNm prin acțiunea unei enzime de origine probabil celulară (Ambros și Baltimore, 1980). Nu se știe dacă VPg mai intervine și în alte etape ale replicării virale, dar, întrucît numai VPg-ARN poate fi încapsidat, s-ar putea să aibă o funcție și în asamblare și/sau să poată fi folosit în reglarea cantității de ARN de încapsidat față de ARN ce urmează a fi tradus.

Replicarea ARN viral se produce la membrana celulară, în unele centre denumite „complecși de replicare“ (Rekosh, 1977). Funcția asocierii cu membrana nu este pe deplin clarificată, la fel ca și în cazul altor virusuri. Replicarea completă a virusului are loc în citoplasmă, fără nici o intervenție a ADN celular al gazdei.

Asamblarea și eliberarea picornavirusurilor. Se pare că cinetica de asamblare a picornavirusurilor este determinată de concentrarea locală a componentelor virale în imediata vecinătate a membranelor citoplasmatice. Întrucît asamblarea se petrece spontan și *in vitro,* rezultă că nu reclamă în mod special prezența anumitor factori. Autoasamblarea picornavirusurilor parcurge următoarele etape : sinteza poliproteinei care conține cele patru proteine structurale, asocierea unor ansambluri pentamerice ale acestei poliproteine, ruperea poliproteinei cu formarea VP_0, VP1 și VP3, asamblarea unei procapside cu 12 pentameri, adăugarea ARN în exteriorul procapsidei și, în final, ruperea proteolitică cu apariția proteinelor mature VP1, VP2, VP3, VP4, concomitent cu internalizarea genomului ARN (Rueckert, 1976). O singură celulă HeLa poate produce, de exemplu, 150 000 de virioni progeni de polio (Baltimore, 1969), ușor de vizualizat prin microscopie electronică, liberi în citoplasmă sau sub forma unor agregate cristaline.

Alterarea metabolismului celular. Virusul polio, la fel ca și celelalte picornavirusuri, produce o substanțială inhibiție a sintezei ARN, ADN și a proteinelor gazdei. Aceste efecte pot fi observate relativ timpuriu în cursul replicării virale ; declinul sintezei ADN este o consecință a scăderii sintezei proteice, deci a unor enzime. Responsabile de aceste modificări par a fi polipeptidele virale nou-sintetizate. De asemenea, declinul sintezei ARN celular s-ar putea datora și faptului că ARN de picornavirusuri nu are structură 5´-cap.

În general, după circa o oră de la infecția cu picornavirusuri, poliribozomii formați încep să disocieze, ribozomii fiind liberi după circa două ore. Pe măsură ce se intensifică sinteza proteinelor virale se reformează și poliribozomii, dar de data aceasta au dimensiuni relativ uniforme, deoarece ARN viral de $2{,}5 \times 10^6$ daltoni a înlocuit ARNm celular heterogen și cu dimensiuni mult mai mici.

6.3.2. REPLICAREA TOGAVIRUSURILOR

Din familia *Togaviridae* fac parte mai multe genuri virale înrudite, între care și alphavirusurile care se replică atît în vectorii artropodici (căpușe și țînțari), cît și în gazda lor vertebrată (mamifere sau păsări).

Alphavirusurile prezintă virioni cu un diametru de circa 70 mm, avînd o nucleocapsidă icosaedrică, înconjurată de un strat lipidic în care se găsesc ancorate două polipeptide glicozilate, de membrană. În virion se află cantități echimoleculare de polipeptide virale principale, și anume C (proteina nucleocapsidei, cu masa moleculară de 30 000 daltoni), E1 și E2 (proteine de înveliș, cu o masă de 50—60 000 daltoni). La virusul Semliki Forest s-a mai pus în evidență și E3, care la alte alphavirusuri se pierde în mediul de cultură. Genomul acestor virusuri este reprezentat de un

ARN infectant, de 12 000 de baze, cu structură 5′-cap și 3′-poliadenilat. Majoritatea cunoștințelor asupra acestor virusuri au fost dobîndite prin studierea virusului Sindbis sau a virusului Semliki Forest.

Ciclul de replicare. În general, togavirusurile cultivă cu titruri ridicate. Perioada latentă este de numai trei ore pentru unele alphavirusuri. Virionii apar din celule prin înmugurire, în urma replicării lor citoplasmatice.

Strategia de traducere a ARN din alphavirusuri. După infecție alphavirusurile produc două molecule de ARNm (Strauss și Strauss, 1977), dintre care una pare a fi identică cu ARN viral (și este tradusă la unele proteine virale nestructurale), iar cealaltă este reprezentată de un ARN subgenomic, transcris pe treimea 3′-terminală a ARNgenomic (și de pe care se traduc proteinele virale structurale). Atît primul tip de mesager, cît și cel de-al doilea au structuri 5′-cap și sînt 3′-poliadenilați, iar strategia lor de traducere este redată în fig. 6-18. În general, în funcție de alphavirus, traducerea începe la un codon AUG situat la 60—80 de nucleotide distanță de capătul 5′ al ARN (Ou și colab., 1983).

Din fig. 6-18 reiese că, în cazul virusului Sindbis, prin traducerea ARN viral apar două proteine-precursor, și anume produsul major de 2 513 aminoacizi terminat la codonul opal UGA, în zona nucleotidelor

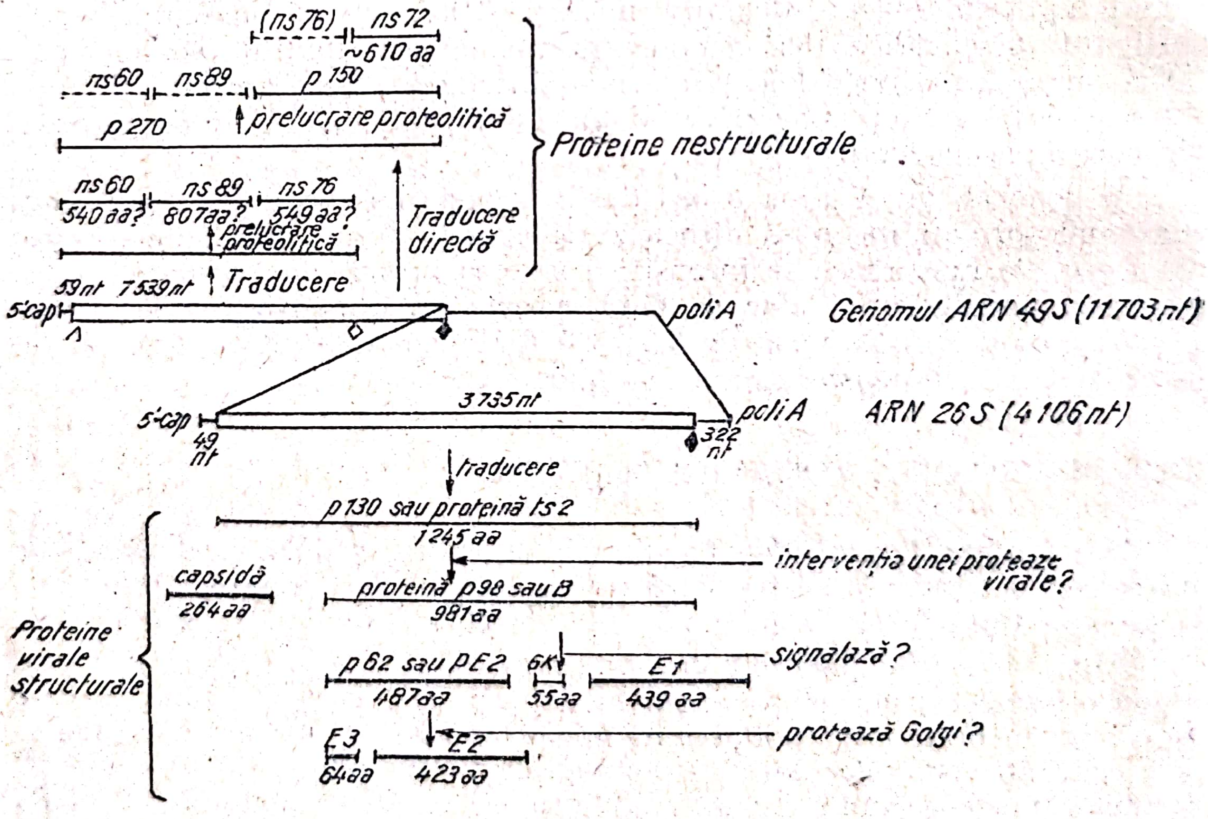

(ns 76)
ns 72
~610 aa
ns 60
ns 89
p 150
p 270
prelucrare proteolitică
Proteine nestructurale
ns 60
ns 89
ns 76
540 aa?
807 aa?
549 aa?
prelucrare proteolitică
Traducere directă
59 nt
7 539 nt
Traducere
5′-cap
poli A
Genomul ARN 49 S (11 703 nt)
3 735 nt
5′-cap
49 nt
322 nt
poli A
ARN 26 S (4 106 nt)
traducere
p 130 sau proteină ts 2
1245 aa
intervenția unei proteaze virale?
capsidă
264 aa
proteină p 98 sau B
981 aa
Proteine virale structurale
p 62 sau PE2
487 aa
6K
55 aa
E1
439 aa
signalază?
E3
64 aa
E2
423 aa
protează Golgi?

Fig. 6-18 — Strategia de replicare a virusului Sindbis.
△ — codoni de inițiere ; ♦ — codoni de terminare ; ◇ — codonul UGA citit pentru producerea proteinei nestructurale ns72 (după Ou și colab., 1982 ; Rice și Strauss, 1981 ; Strauss și Strauss, 1983) (detalii în text).

5 748—5 750, precum și o poliproteină minoră, rezultată prin citire suprapusă *(readthrough)* și care se termină la o serie de codoni de terminare a traducerii. Pe măsură ce se formează, poliproteina majoră suferă și prelucrările care, în final, vor da naștere la trei produse identificate atît *in vitro*, cît și în extractele de celule infectate (Schlesinger și Kääriäinen, 1980 ; Collins și colab., 1982).

Analiza genetică efectuată de Strauss și Strauss (1980) a sugerat că pentru replicarea ARN din virusul Sindbis sînt necesare patru polipeptide nestructurale, cu posibile funcții de replicaze/transcriptaze și de proteaze specific virale, necesare prelucrării precursorilor. Mecanismul de citire suprapusă permite o modulare a cantităților relative ale activităților enzimatice. Pentru proteina nestructurală ns72, sintetizată în cantități mici, s-a propus o funcție de factor reglator al controlului sintezei catenei negative (Strauss și colab., 1983).

Proteinele structurale ale alphavirusurilor sînt traduse de pe un mesager subgenomic, a cărui secvență a fost complet descifrată pentru unii reprezentanți ai grupului (Sindbis — Rice și Strauss, 1981 ; Ou și colab., 1982 ; Semliki Forest — Garoff și colab., 1980) și corespunde treimii 3′-terminale a genomului. Utilizarea ARNm subgenomic pentru producerea proteinelor virale permite amplificarea acestor produse în cantitățile necesare asamblării virionilor progeni. În celulele infectate cu alphavirusuri, ARNm viral subgenomic reprezintă 90% din ARN de origine virală, față de 10% corespunzător ARN de dimensiuni genomice.

Spre deosebire de picornavirusuri, la alphavirusuri gena pentru replicaze se află în zona 5′, iar genele proteinelor structurale spre capătul 3′.

Potrivit lucrărilor lui Ou și colab. (1982), traducerea proteinelor structurale de pe ARNm subgenomic de 4 106 nucleotide (vezi fig. 6-18) începe la un codon AUG așezat la circa 50 de nucleotide de capătul 5′-terminal și continuă pînă la un codon de terminare care se află în zona nucleotidelor 260—520, de la capătul 3′-poliadenilat (Rice și Strauss, 1981). Prin autoproteoliză, cu ruperea unei legături Trp-Ser, se prelucrează capătul N-terminal al proteinei capsidale nascente ca precursor ; se pare că activitatea de tip chimiotriptic ar rezida chiar la capătul —COOH al proteinei capsidale (Schlesinger și Kääriäinen, 1980).

Îndepărtarea proteinei capsidei de pe precursor permite intrarea în funcție a unei secvențe de 19 aminoacizi, care permite integrarea unui precursor glicoproteic PE2 în reticulul endoplasmatic, paralel cu glicozilarea sa (Garoff și colab., 1979 ; Bell și colab., 1982). Din PE2 se formează proteinele E2 și E3. Odată cu PE2 se eliberează din precursor și proteina E1 care se inserează și ea în reticul, unde se glicozilează.

Odată sintetizate și inserate în reticulul endoplasmatic, glicoproteinele migrează — via aparatul Golgi — spre membrana plasmatică (Garoff și colab., 1980).

În concluzie, formarea proteinelor structurale ale alphavirusurilor implică participarea uneia sau mai multor proteaze active asupra poliproteinei precursoare nestructurale, a unei activități proteazice ce se află în însăși proteina capsidei cu rol autocatalitic, precum și intervenția unor proteaze celulare localizate în organitele celulare.

Replicarea și transcrierea ARN din alphavirusuri. La replicarea alphavirusurilor s-au pus în evidență trei activități de sinteză a ARN, și anume o replicază, care sintetizează pe matrița ARN viral o catenă negativă completă, o altă replicază (care formează o catenă „+“ integrală pe catena „—“), precum și o transcriptază, pentru producerea tot pe matrița catenei „—“ a ARNm subgenomic, de pe care ulterior se traduc proteinele virale structurale. Fiecare dintre aceste activități este reglată independent și fiecare enzimă recunoaște anumite semnale specifice.

Strauss și Strauss (1983) postulează însă existența a patru activități enzimatice: trei activități de inițiere a catenelor ARN „—“, „+“ și subgenomici și o enzimă de elongare a ARN, care continuă sinteza catenelor odată inițiate. Aceste activități pot avea patru suporturi materiale diferite sau pot exista grupate pe unul și același polipeptid. Funcțiile de inițiere și elongare pot fi exprimate de o enzimă care să fie, de fapt, un complex funcțional de mai multe lanțuri polipeptidice acționînd diferențiat.

Ou și colab. (1981, 1982) au arătat că replicaza pentru sinteza catenei „—“ poate recunoaște o secvență de 19 nucleotide la capătul 3′ al catenei „+“, care — așa cum reiese din fig. 6-19 — este puternic conservată de alphavirusuri. De asemenea, aceeași enzimă mai recunoaște și/sau o structură adițională, ipotetic situată în apropierea capătului 5′ al ARN genomic și avînd aspectul din fig. 6-20, iar interacțiunea sa cu capătul 3′ al aceluiași ARN s-ar putea realiza printr-o eventuală ciclizare a moleculei (Frey și colab., 1979).

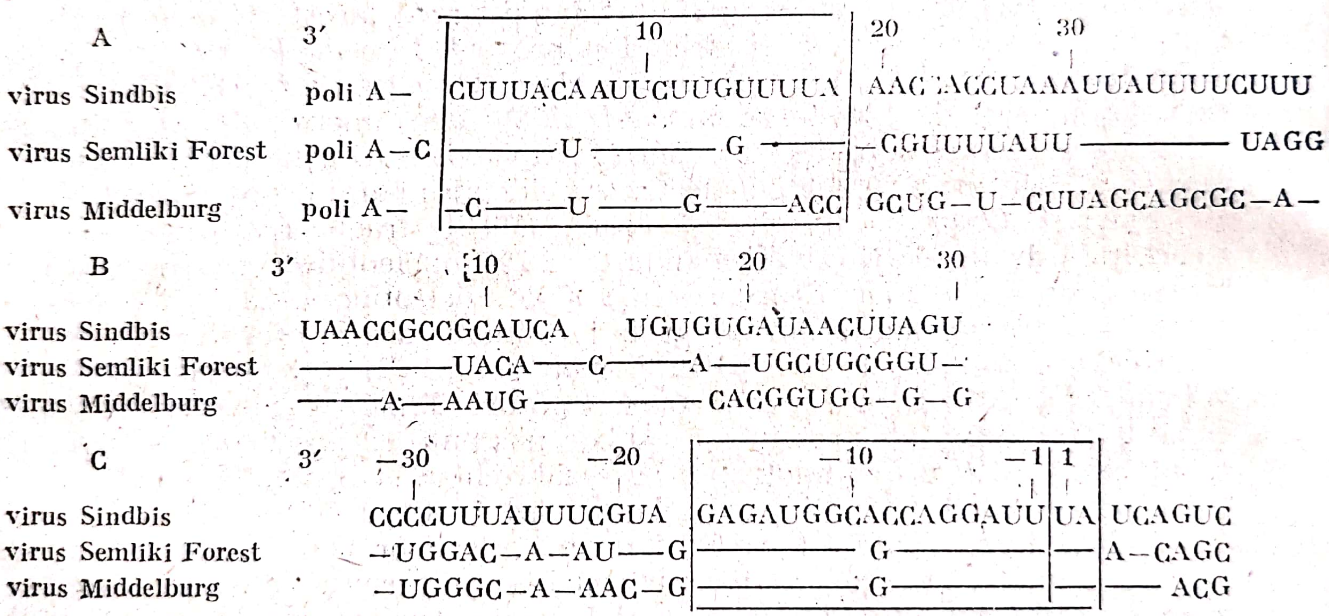

A
3′
10
20
30
virus Sindbis
poli A—
CUUUACAAUUCUUGUUUUA
AACGACGUAAAUUAUUUUCUUU
virus Semliki Forest
poli A—C
————U————G————
—GGUUUUAUU————UAGG
virus Middelburg
poli A—
—C————U————G————ACC
GCUG—U—CUUAGCAGCGC—A—
B
3′
10
20
30
virus Sindbis
UAACCGCCGCAUCA UGUGUGAUAACUUAGU
virus Semliki Forest
————UACA——C————A——UGCUGCGGU—
virus Middelburg
———A——AAUG————CACGGUGG—G—G
C
3′
—30
—20
—10
—1
1
virus Sindbis
CCCCUUUAUUUCGUA
GAGAUGGCACCAGGAUU
UA
UCAGUC
virus Semliki Forest
—UGGAC—A—AU——G
————G————
——
A—CAGC
virus Middelburg
—UGGGC—A—AAC—G
————G————
——
——ACG

Fig. 6-19 — Secvențe conservate în ARN de alphavirusuri.
A — secvențe 3′— terminale; *B* — secvențe complementare capătului 5′ al ARN, citite pe antigenom; *C* — secvențe complementare zonei de joncțiune, citite pe antigenom (în *casete* — secvențe conservate; *liniile* — identitatea nucleotidelor, iar întreruperea s-a făcut pentru aliniere) (după Ou și colab., 1982).

În cursul infecției, sinteza catenei „—“ încetează în mod normal la 3—4 ore de la infectare (Sawicki și Sawicki, 1980).

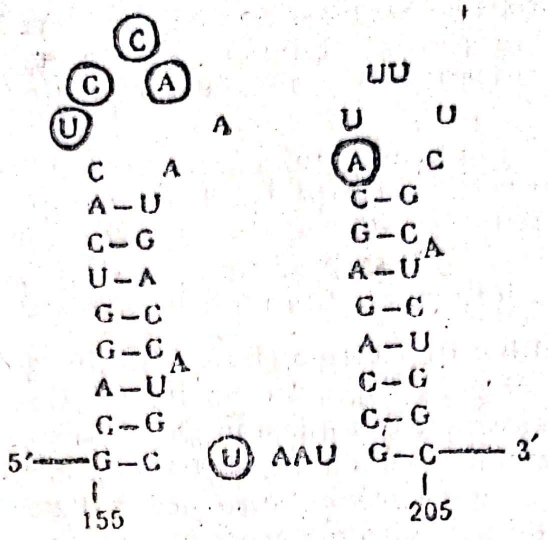


Fig. 6-20. — Conservarea structurii ARN de alphavirusuri. O posibilă structură secundară în zona capătului 5′ al genomului virusului Sindbis (în *cerc* — nucleotide care diferă în funcție de alphavirus) (după Ou și colab., 1983).

Catena „—“ este utilizată drept matriță de către replicază pentru sinteza catenei „+“. La capătul 5′ al catenei negative s-a pus în evidență prezența unei structuri secundare „în ac-de-păr“ cu o alcătuire mai deosebită (fig. 6-21) (Ou și colab., 1983) decît cele îndeobște identificate în ARNm. De aceea s-a emis ipoteza implicării sale directe în recunoașterea de către replicază pentru sinteza catenei „+“, care astfel poate iniția sinteza ARN alphaviral progen. Se observă că acest semnal diferă de cel pentru inițierea sintezei catenei „—“ (vezi fig. 6-20), de unde ideea că reglările celor două sinteze au loc prin mecanisme diferite.

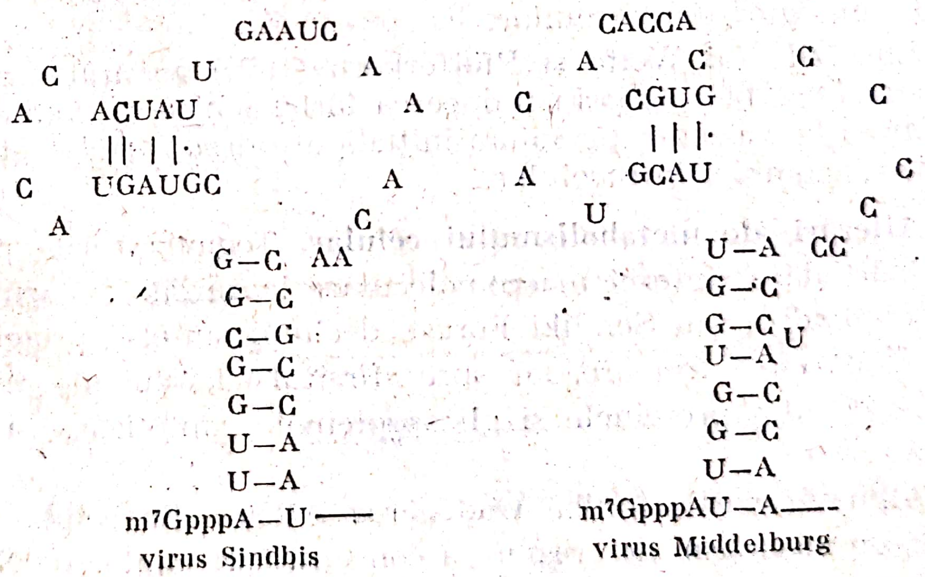


Fig. 6-21 — Structuri secundare terminale în ARN de alphavirusuri (după Ou și colab., 1983).

Pe catena negativă se realizează și sinteza ARNm subgenomic. Se constată existența unei secvențe bine conservate de 21 de nucleotide (vezi fig. 6-19), propusă ca centru de recunoaștere pentru transcriptază (Ou și colab., 1982).

Pentru moment, implicarea unor componente celulare — enzime și factori — în replicarea și transcrierea ARN al alphavirusurilor este mai mult bănuită decît demonstrată, deși s-au întreprins studii în acest sens (Kowal și Stollar, 1981). Mai trebuie menționat și faptul că această replicare se petrece în asociere cu membranele citoplasmatice.

Asamblarea și eliberarea virusurilor. Studiile de microscopie electronică au demonstrat clar că alphavirusurile își dobîndesc învelișul prin înmugurire din membranele citoplasmatice (Matsumura și colab., 1971). Prima etapă în asamblare constă în asocierea ARN viral cu proteina nucleocapsidei, care apoi migrează spre acele zone ale membranei unde s-au inserat glicoproteinele virale ; procesul este rapid și eficient (Brown, 1980). Se pare că încapsidarea începe la o secvență specifică aflată în apropierea capătului 5′ al ARN genomic. Posibil să aibă loc interacțiuni electrostatice între ARN și proteina nucleocapsidei, bogată în reziduuri de prolină (Garoff și colab., 1980 ; Rice și Strauss, 1981). Pe de altă parte, Strauss și Strauss (1977) consideră că și zona C-terminală a proteinei ar putea interacționa cu genomul. Oricum, absența fie a ARN 49 S genomic, fie a proteinei nucleocapsidei în stare liberă, pledează pentru formarea nucleocapsidei în dublul strat lipidic de origine celulară, în care s-au inserat glicoproteinele virale. Uneori se poate observa o intensă proliferare a vacuolelor în celulele gazdei, ceea ce s-ar putea pune în legătură cu rolul membranelor în însăși replicarea ARN viral, mai degrabă decît cu procesul de înmugurire a virionilor.

Lucrările lui Weite și Pfefferkorn (1970) au arătat că înmugurirea poate fi total blocată prin reducerea tăriei ionice a mediului, în timp ce revenirea la concentrația salină inițială are drept efect o eliberare masivă de virus acumulat intracelular.

Alterări ale metabolismului celular. Togavirusurile produc o inhibare parțială a sintezei macromoleculare la gazdă. În cazul infecțiilor cu virusul Sindbis sau Semliki Forest, declinul sintezei proteice este detectabil după circa trei ore, iar spre sfîrșitul ciclului de replicare virală peste 90% din proteinele și glicoproteinele sintetizate sînt de origine virală.

Alphavirusurile inhibă traducerea ARNm din celula-gazdă, aparent printr-un mecanism de creștere a concentrației ionilor de Na^+, paralel cu scăderea concentrației ionilor de K^+ intracelulari (Garry și colab., 1979), condiții în care rămîn funcționali doar ARNm virali. Deci, se poate presupune interferența ciclului de multiplicare virală cu pompa Na^+/K^+ celulară (Garry și colab., 1979).

Calicivirusurile sînt oarecum asemănătoare cu alphavirusurile în ceea ce privește traducerea replicazei/transcriptazei de pe genomul ARN și a proteinei capsidale de pe un ARN subgenomic. Dar, calicivirusurile se aseamănă parțial și cu picornavirusurile (între care au fost incluse inițial), deoarece ARN al lor este 3′-poliadenilat, iar la capătul 5′ le lipsește structura „cap“, fiind înlocuită de o mică proteină 5′-VPg — cu rol în replicare și în infectivitate.

6.3.3. REPLICAREA CORONAVIRUSURILOR

Dintre coronavirusuri fac parte numeroase virusuri cu genom ARN monocatenar nesegmentat cu catenă „+“, implicate într-o serie de boli degenerative la animale și care pot servi eventual ca modele pentru unele maladii degenerative umane, de etiologie necunoscută pentru moment.

Virionii Corona de 75—160 nm au înveliș, iar proiecțiile caracteristice, provenind din stratul dublu lipidic, sînt cele care le-au dat denumirea. ARN genomic al coronavirusurilor este unul dintre cele mai mari molecule de ARN viral, avînd circa 180 000 de nucleotide și este încapsidat într-o structură helicoidală, complexat cu o singură specie polipeptidică cu o masă de 60 000 daltoni. Glicoproteina externă peplomeră E2 are o masă de 180 000 daltoni, dar uneori poate fi scindată la alte două specii neidentice. Nucleocapsida este protejată de o altă glicoproteină, E1 sau proteina-*matrix*, cu o masă de 25 000 daltoni.

În general, strategia de replicare a acestor virusuri presupune sinteza a 5—6 ARNm subgenomici *(B—G)*, care împreună cu ARN genomic *(A)* formează un „set“ (fig. 6-22) (Siddell și colab., 1982). Toți ARN dintr-un „set“ au structuri 5′-cap și 3′-poliadenilate. Proteina nucleocapsidei este tradusă la capătul 3′ al ARNm7 și posttranslațional va fi fosforilată. Proteina-*matrix* este tradusă de la capătul 3′ al ARNm6 și ulterior suferă glicozilarea moleculei. Glicoproteina E2 este tradusă de la ARNm3 ; ea va fi supusă unor prelucrări, așa încît în final va conține lanțuri polizaharidice legate N-glicozidic și unele lipide atașate covalent.

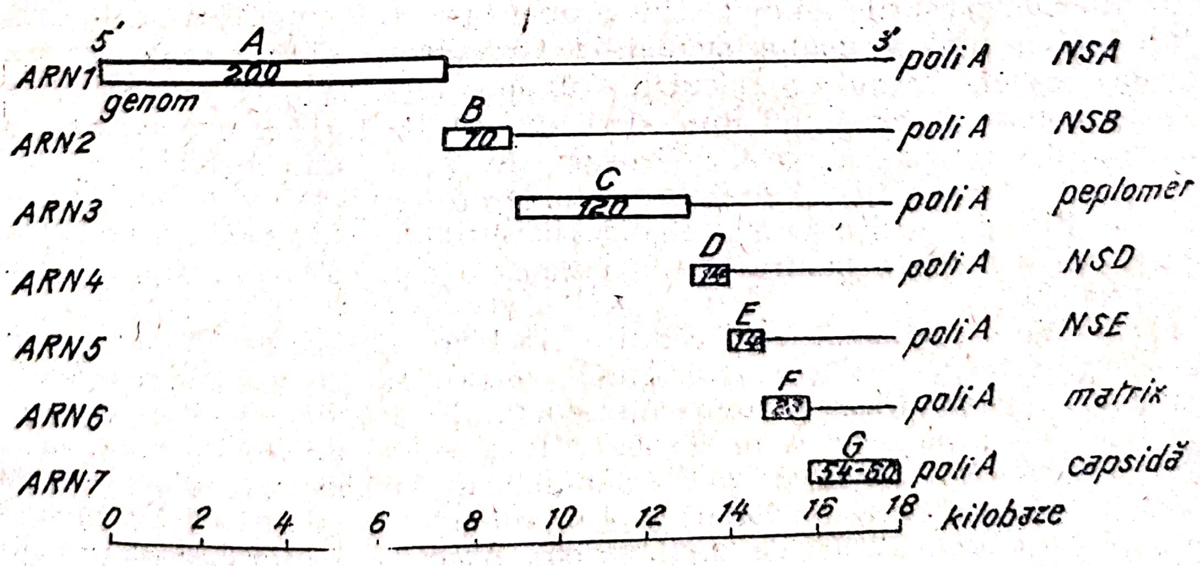


Fig. 6-22 — Strategia de replicare a coronavirusurilor ; se menționează masa moleculară a polipeptidelor în kilodaltoni (după Siddell și colab., 1982).

ARN de coronavirusuri are un caracter infectant, deci pentru a se forma replicaza/transcriptaza trebuie ca ARN să fie tradus. În infecția cu coronavirusuri s-au pus în evidență 2—3 polipeptide nestructurale, dar rolul lor rămîne încă obscur.

Nici mecanismele implicate în transcrierea ARNm subgenomici nu sînt deocamdată descifrate, dar s-a constatat că fiecare ARN este transcris independent (Jacobs și colab., 1981), oarecum analog mecanismului de la alphavirusuri. Oricum, sintezele acestor ARN produc cantități inegale ale diverselor specii, dar nu se cunoaște modul de control al reacțiilor respective.

Asamblarea și eliberarea coronavirusurilor se aseamănă întrucîtva proceselor de la togavirusuri și are loc în reticulul endoplasmatic (Siddell și colab., 1982).

Multiplicarea unor coronavirusuri este inhibată de către α-amanitină, în anumite celule, ceea ce ar sugera și intervenția unor componente celulare, cum ar fi unele subunități ale ARN polimerazei gazdei, în acest proces.

În general, multe coronavirusuri produc gazdelor lor naturale infecții persistente, răspunsul organismului la infecția virală prezentînd astfel un deosebit interes.

6.3.4. REPLICAREA RHABDOVIRUSURILOR

Din familia *Rhabdovirusurilor* fac parte numeroase virusuri al căror genom este reprezentat de un ARN cu catenă negativă, nesegmentată, fără caracter infectant. Virusurile incluse în această familie au formă de obuz sau baciliformă, care le face ușor de recunoscut la microscopia electronică, cu o lungime de 170—380 nm și cu un diametru de 50—70 nm. În exterior, virionii respectivi au un înveliș lipoproteic de formă cilindrică, cu peplomeri proeminenți de circa 10 nm. În interiorul acestui cilindru se află spirala nucleoproteinei, care conferă preparatelor de microscopie un aspect striat.(Bishop și Smith, 1977 ; Matthews,1982).

Rhabdovirusurile animale sînt grupate în două genuri : vesiculovirusuri sau grupul virusului stomatitei veziculoase și lyssavirusurile sau grupul rabiei. Studiul pe calculator al unor glicoproteine de VSV și de virus rabic le-a permis lui Rose și colab. (1982) să găsească dovezi ale ascendenței comune a acestor virusuri. În plus, antigenele nucleoproteice ale acestor virusuri prezintă un oarecare grad de reactivitate încrucișată. Biologia moleculară a rhabdovirusurilor a fost studiată pe VSV, un virus nepatogen pentru specia umană și care are un ciclu rapid de multiplicare.

Se știe că genomul VSV codifică cinci proteine ce pot fi regăsite în proporții diferite în virion, trei fiind constituenți majori ai particulei. Astfel, s-au identificat proteina glicozilată G a peplomerelor exterioare, avînd o masă moleculară de 55 000 daltoni (1 800 de copii/virion), proteina-*matrix* M, cu masa de 26 000 daltoni, care învelește suprafața internă a dublului strat lipidic (4 000 de copii), proteina nucleocapsidei N cu masa de 47 000 daltoni (2 000 de copii/virion). Asociate nucleocapsidei se mai găsesc și proteina L de 160 000 daltoni (50 de copii) și NS cu masa de 25 000 daltoni (200 de copii). Lyssavirusurile, a căror caracterizare moleculară a rămas în urma VSV din cauza marii lor patogenități pentru om, au de asemenea cinci proteine, denumite L, G, N (și care corespund cu cele de la VSV) (Coslett și colab., 1980), M2 — proteina de matrice (prezentă în virion în mai mult de 1 000 de copii și analoagă cu M din VSV) — și M1 cu masa de 39 500 daltoni, existînd în două forme fosforilate (Cox și colab., 1982) și corespunzînd lui NS din VSV.

Genomul VSV cuprinde circa 11 000 de nucleotide și are o masă moleculară de $3,8 \times 10^6$ daltoni. Genele proteinelor mai sus-menționate sînt aranjate în ordinea prezentată în fig. 6-23. Prin transcrierea genomului se sintetizează cinci mesageri monocistronici de 6,5 ; 1,6 ; 1,3 ; 0,8 și 0,7 kilobaze fiecare, traduși apoi respectiv la proteinele L, G, N, M, NS. Toți ARNm maturi prezintă structuri 5′-cap și 3′-poliA. La capătul 3′ se mai află și o secvență de 46 de nucleotide — desemnată T — care prin transcriere formează un oligonucleotid cu rol de „*leader* al catenei pozitive“. În mod corespunzător, la capătul 5′ al moleculei se află secvența R, complementară lui T (fig. 6-24). Și din celulele infectate cu virus rabic s-au izolat cinci specii de ARNm subgenomici cu polaritate opusă genomului, care prin traducere *in vitro* au sintetizat cele cinci proteine ale virusului rabic (Pennica și colab., 1980). La fel ca și la vesiculovirusuri se constată o polaritate specifică de transcriere cu sensul 3′-N-M1-M2-L-5′ (Flamand și Delagneau, 1978), în care localizarea G pare a fi între M2 și L, ca și la VSV.

Ciclul de replicare. VSV cultivă cu o viteză foarte mare, perioada latentă fiind scurtă, doar de 2,5 ore.

Inițierea infecției. La fel ca și la alte virusuri cu înveliș, și rhabdovirusurile pot pătrunde în celulă atît prin viropexie, cît și prin fuziune, putîndu-se pune în evidență prezența proteinelor de înveliș G și M în membranele citoplasmatice, în timp ce ribonucleocapsida a fost identificată liberă în citoplasmă.

Strategia de transcriere. În urma adsorbției și pătrunderii în celulele susceptibile, pe nucleocapsida intactă care conține NS și L (îndepărtarea lor distruge activitatea transcriptazică) începe transcrierea primară, care are drept rezultat formarea celor cinci ARNm subgenomici, monocistro-

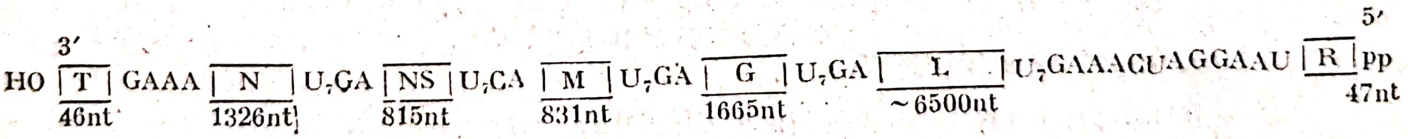


Fig. 6.23 — Organizarea moleculară a genomului VSV. Nucleotidele dintre casete nu se transcriu în ARNm (după Strauss și Strauss, 1983).

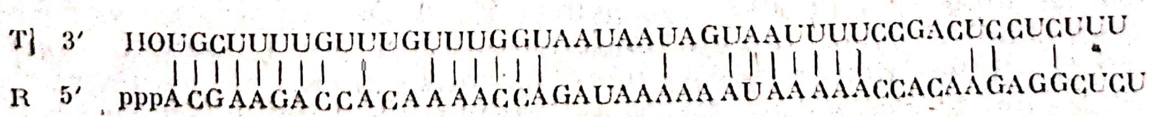

T 3′ HOUGCUUUUGUUUGUUUGGUAAUAAUAGUAAUUUUCCGACUCCUCUU
R 5′ pppACGAAGACCACAAAACCAGAUAAAAAAUAAAAACCACAAGAGGCUCU

Fig. 6-24 — Secvențele 3′-T și 5′-R terminale ale ARN din VSV (după Strauss și Strauss, 1983).

nici deja menționați. Așa cum au arătat Bishop și Smith (1977), această transcriere este independentă de sinteza proteică a gazdei sau de funcțiile sale nucleare. Acești ARNm subgenomici sînt traduși la cele cinci proteine virale care, la rîndul lor, produc accelerarea sintezei mesagerilor, cunoscută ca transcriere secundară.

Proteina NS apare în virion sub formă NS1 mai puțin fosforilată, cu o slabă acțiune de transcriere, și NS2 mai intens fosforilată și mult mai activă ; adăugarea NS1 la NS2 stimulează și mai mult transcrierea (Kingsford și Emerson, 1980). Fiszman și colab. (1974) au observat că legarea NS2 orientează mai mult spre transcriere, în timp ce NS1 ar înclina balanța spre replicare.

Transcrierea ARNm începe cu atașarea polimerazei în zona capătului 3′ al catenei genomului ; se sintetizează întîi ARN *leader* și apoi ARNm în ordinea secvențială deja precizată, direct sub forma ARN monocistronici.

ARN *leader*, cu secvențele deja descifrate pentru diferite tulpini de VSV (McGeoch și Dolan, 1979 ; Rowlands, 1979), pare a avea două domenii funcționale ; la capătul 3′ s-au identificat 18—20 de nucleotide complementare, total sau parțial, cu alte 18—20 de nucleotide de la capătul 5′. S-ar putea ca aceste zone să constituie centrul primar de recunoaștere pentru transcriptază/replicază, iar restul secvenței *leader* să conțină semnale adiționale importante pentru modularea transcrierii și replicării. Studiile de metilare au arătat că NS — considerată proteina-inițiator al transcrierii — se leagă la catena ARN „—“ între nucleotidele 16 și 30 (Keene și colab., 1981).

Citirea genomului în sensul 3′ → 5′ relevă că între secvența *leader* și gena N se găsesc patru nucleotide care nu sînt transcrise (Keene și colab., 1980). Transcrierea ARNm corespunzător genei N începe cu o secvență AACAG, care se poate ulterior regăsi la capetele 5′ ale tuturor ARNm, apoi se transcriu cele 1 326 de nucleotide și se ajunge la o zonă de șapte reziduuri de uracil. În acest loc, enzima de transcriere are o mică „ezitare“, adăugînd la ARNm un capăt de 3′-poliA. Analiza cinetică a transcrierii *in vitro* a confirmat această ipoteză (Ball și Wertz, 1981 ; Iverson și Rose, 1981). Următoarele două nucleotide GA nu apar în transcripții maturi, iar ARNm al genei NS începe cu următorul nucleotid. Pentru fiecare genă se repetă evenimente similare, întrucît din fig. 6-23 se observă că structura intergenică este practic aceeași.

Ca produse considerate aberante s-au pus în evidență și unii transcripți policistronici, cu joncțiuni intergenice de dinucleotide și poliA (Herman și Lazzarini, 1981).

Replicarea ARN. Mașinăria de sinteză a ARN al rhabdovirusurilor are două moduri diferite de acțiune și poate exista sub două forme funcționale distincte, orientate spre transcriere sau spre replicare. Replicarea necesită enzime de inițiere la capătul 3′ al genomului ARN, enzime care să ducă procesul pînă la capătul 5′, cu transcrierea fidelă a noii catene „+“ pe matrița „—“, ignorînd în același timp semnalele interne de terminare și reinițiere din transcrierea ARN. Noua catenă „+“, la rîndul ei, servește ca matriță pentru sinteza catenei „—“ integrale. Centrul primar de recunoaștere atît pentru sinteza catenei antigenomului, cît și pentru cea a genomului ar putea fi secvența nucleotidelor de la capătul 3′, cu amintita omologie 3′(T)—5′(R) (vezi fig. 6-24). Mai este implicat în această recunoaștere și centrul de legare a proteinei NS. Orientarea spre replicare poate fi pusă, așa cum au sugerat Huang și colab. (1980), și pe seama rolului modulator care revine unei secvențe de 55 de nucleotide de la capătul 3′ al catenei antigenomului.

In vivo, replicarea începe la circa 45 de minute după infectare și are nevoie de sinteză proteică continuă, ceea ce o deosebește de transcrierea primară. În controlul replicării sînt implicate și proteinele virale M, care inhibă transcrierea *in vitro* (Wilson și Lenard, 1981), și N (Blumberg și colab., 1981).

S-ar putea ca replicarea, adică copierea directă a ARN de către replicază, să aibă loc pe o ribonucleoproteină cu structură mai relaxată decît cea reclamată de transcriere. Proteina M, care interacționează cu ribonucleoproteina, ar putea și ea interveni în reglarea transcrierii/replicării prin variația gradului ei de fosforilare, ceea ce ar duce la o rearanjare conformațională a complexului de sinteză a ARN. Această ideea asupra rolului de „placă turnantă" a modificării conformației este susținută și de reușita separării în gradient a complexului de replicare de cel de transcriere. Naeve și Summers (1980) au identificat la microscopul electronic complexul de replicare sub forma unei structuri circulare răsucite.

S-a mai propus și o altă ipoteză în ceea ce privește orientarea spre transcriere sau spre replicare, cu implicarea proteinei N și a funcției de *leader* a anumitor secvențe de ARN, dar pentru moment nici unul dintre aceste mecanisme nu explică total reglarea și controlul în procesul de replicare/transcriere, cu atît mai mult cu cît par să intervină și unele elemente de gazdă (Szilágyi și colab., 1977), precum și un control temporal (Simonsen și colab., 1979).

Strategia de traducere. Traducerea ARNm monocistronici izolați din celulele infectate cu VSV produce polipeptide identice cu N, NS, L și M, dar un precursor al lui G.

Pînă în prezent s-a reușit descifrarea secvențelor genelor N, NS, M, G (Gallione și colab., 1981 ; Rose și Gallione, 1981), pe baza lor descriindu-se și organizarea fiecărui mesager, precum și produsele corespunzătoare, prezentate în fig. 6-25. Toți ARNm au o zonă 5′ de 10—41 de nucleotide care nu se traduc, iar codonii de terminare a traducerii sînt UAG sau UAA. Zona 3′ intraductibilă variază în limitele a 47—139 de nucleotide.

Posttranslațional, M și NS sînt prelucrate prin fosforilare, în timp ce G, care se formează ca precursor, pierde o secvență-semnal de 16 aminoacizi hidrofobi, se glicolizează la doi centri și se esterifică cu acizi grași la aparatul Golgi (Ghosh și colab., 1981).

Asamblarea și eliberarea rhabdovirusurilor. VSV este eliberat din celule prin înmugurire, în special din membrana citoplasmatică, dar și din unele vezicule citoplasmatice (Zee și colab., 1970). Un rol major revine proteinei-*matrix* M, care servește atașării ribonucleoproteinei și doar apoi are loc înmugurirea propriu-zisă, la acele centre de pe membrană la care s-a inserat glicoproteina G ; această inserție este un proces cotranslațional și ca semnal se utilizează, în acest caz, capătul N-terminal

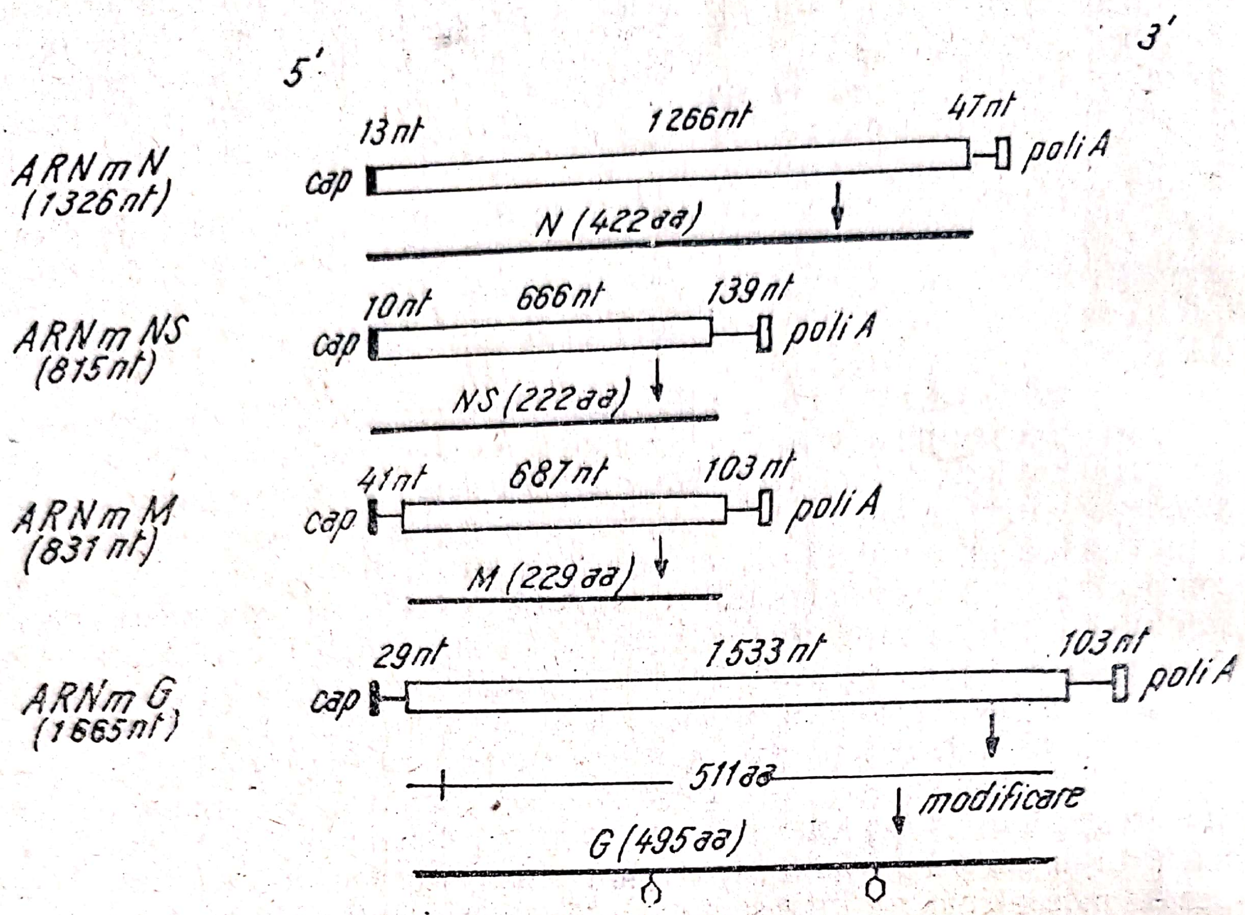

5′
3′
ARNm N (1326 nt)
13 nt
1266 nt
47 nt
cap
poli A
N (422 aa)
ARNm NS (815 nt)
10 nt
666 nt
139 nt
cap
poli A
NS (222 aa)
ARNm M (831 nt)
41 nt
687 nt
103 nt
cap
poli A
M (229 aa)
ARNm G (1665 nt)
29 nt
1533 nt
103 nt
cap
poli A
511 aa
modificare
G (495 aa)

Fig. 6-25 — Traducerea ARNm-VSV pentru genele N, NS, M și G. *Linia întărită* la capătul 5′ — pentanucleotidul comun AACAG ; *caseta* de la capătul 3′ — tetranucleotidul comun UAAG ; ⬡ — centrii de glicozilare ai lui G (după Strauss și Strauss, 1983).

al proteinei (Lodish și colab., 1981). În paralel are loc și glicozilarea posttranslațională. Transportul glicoproteinelor se face în vezicule învelite în clatrine.

În cazul virusului rabic, Matsumoto și Kawai (1969) au constatat că modul de înmugurire este dependent și de tipul de celulă-gazdă : în neuroni, morfogeneza virală este limitată la membranele intracitoplasmatice strîns asociate incluziilor virale, în timp ce în culturile de fibroblaste de pui înmugurirea se face din membrana citoplasmatică.

Alterarea metabolismului celular. Modificările induse în celule variază de la virus la virus. Astfel, aceste alterări sînt minime în cazul unor infecții persistente cu virus rabic, cînd celulele infectate continuă să producă virus aproape nedefinit în timp, în timp ce în celulele infectate cu VSV sinteza ARN celular și a proteinelor este inhibată (Wagner, 1975), se pare pe seama competiției între transcripții mesageri celulari și cei virali (Lodish și Porter, 1981). Huang și colab. (1970) au demonstrat de altfel că poliribozomii mari celulari sînt distruși în primele trei ore după infecție, după care apare o nouă populație de polizomi, mult mai mici, specific virali, care ating un maxim după circa patru ore.

6.3.5. REPLICAREA PARAMYXOVIRUSURILOR

Paramyxovirusurile au dimensiuni relativ mari între virusuri, măsurînd 120—150 nm.

Genomul paramyxovirusurilor este un ARN cu catenă negativă continuă, rezultat prin înlănţuirea a 16 000—18 000 de baze. ARN complexat cu circa 2 600 de copii ale polipeptidului NP (cu masa moleculară de 60 000 daltoni) se află într-o capsidă cu simetrie helicoidală. Capsida este învelită într-un dublu strat lipidic de origine celulară, în care sînt incrustate două glicoproteine : HN, avînd o masă de circa 69 000 daltoni, şi F, cu masa moleculară de 53 000 daltoni. În interior, acest înveliş este căptuşit cu polipeptidul-*matrix* M (Choppin şi Compans, 1975). În capsidă se mai află două tipuri de polipeptide, şi anume : circa 30 de copii ale unei proteine mari L (masa de 75 000 daltoni) cu posibil rol de polimerază, precum şi circa 300 de copii ale unei proteine asociate nucleoproteinei N, cu o masă de 46 000 daltoni.

Pe baza unor diferenţe morfologice şi a modului diferit de comportare, din punct de vedere al activităţii biologice a glicoproteinei HN, Choppin şi Compans (1975) au distins trei genuri, şi anume : paramyxovirusuri (HN prezintă o dublă activitate — hemaglutinantă şi neuraminidazică), morbillivirusuri (HN are doar activitate hemaglutinantă) şi pneumovirusuri (HN nu are nici un fel de activitate).

Infecţia cu paramyxovirusuri se aseamănă celei cu rhabdovirusuri, dar, deoarece multiplicarea în culturi de celule a paramyxovirusurilor este relativ slabă, se ştie destul de puţin despre biologia lor moleculară. Datele cunoscute s-au acumulat pe baza investigaţiilor biochimice întreprinse pe virusul bolii Newcastle (NDV), pe virusul Sendai (tulpină de paramyxovirus de tip 1) şi pe virusul simian 5 (SV5) (paramyxovirus de tip 3), astfel încît cele ce urmează reprezintă, de cele mai multe ori, o sinteză generală a rezultatelor respective.

Ca în cazul tuturor virusurilor cu catenă negativă de ARN, infectantă este nucleocapsida şi nu ARN viral deproteinizat. Prin transcripţie primară se formează cel puţin şase specii de ARNm 3′-poliadenilat şi avînd structură 5′-cap. Replicarea paramyxovirusurilor nu este dependentă de nucleul celular, cîtă vreme procesul se poate desfăşura chiar în celulele enucleate, iar formarea ARNm nu este afectată de inhibitori ai sintezei proteice. În cazul NDV s-au pus în evidenţă două clase de ARNm : ARNm 35 S (prin traducere dă naştere unei proteine mari L) şi ARNm 18 S, care a putut fi rezolvat electroforetic la cinci specii, fiecare fiind răspunzătoare de codificarea cîte unei proteine virale unice (Collins şi colab., 1981).

Replicarea genomului se face pe un lanţ antigenomic complet. La fel ca şi transcrierea secundară, replicarea ARN reclamă sinteză proteică virală.

În cazul NDV s-a demonstrat că virionii disrupţi cu detergent pot fi utilizaţi *in vitro* pentru studii de transcriere, reuşindu-se transcrierea întregului genom (Miller şi Stone, 1981). Complexul activ la transcriere este constituit de însăşi nucleocapsidă. De asemenea, s-a putut pune în evidenţă infectivitatea nucleocapsidei virusului Sendai, de către Bukrinskaya şi colab. (1972).

Inițierea infecției. Prezența glicoproteinelor HN și F în învelișul viral este direct responsabilă de atașarea particulelor virale la receptorii celulari și de ulterioara lor pătrundere în celulă prin fuziune cu membranele celulare. Încă din 1971, Homma (1971) a descris un exemplu foarte interesant de modificare a paramyxovirusurilor controlat de gazdă, un fapt care a permis ulterior o mai bună înțelegere a penetrării prin fuziune: în celulele murine L virusul Sendai suferă un singur ciclu de replicare, iar virionii progeni s-au dovedit neinfectanți pentru celulele respective (dar infectanți pentru ou), avînd și o slabă activitate de fuziune. Tratarea progenilor astfel rezultați cu concentrații scăzute de tripsină a făcut ca infectivitatea lor pentru celulele L să crească de 10^3 ori, paralel cu intensificarea activității de fuziune; același rezultat s-a obținut și în cazul tratării directe a celulelor L cu tripsină, în momentul înmuguririi virionilor. Deci tripsina a îndepărtat o mică porțiune polipeptidică din F nativ (F_0) inactiv, transformîndu-l într-o glicoproteină biologic activă în fuziune.

Strategia de transcriere. Deși se știe destul de puțin despre sinteza ARNm și ulterioara lor prelucrare prin adăugarea structurilor 5′-cap și 3′-poliA, s-a arătat totuși că *in vivo* transcrierea se inițiază la un singur promotor, ordinea de transcriere a genelor fiind ușor diferită în cazul diferitelor paramyxovirusuri: 3′-NP-F_0-M-N-HN-L-5′ pentru Sendai (Glazier și colab., 1977) și 3′-NP-N-(F_0, M)-HN-L-5′ pentru NDV (Collins și colab., 1980).

S-a făcut o comparație între genomul NDV și cel al rhabdovirusului VSV; din fig. 6-26 se poate observa o similitudine frapantă din punct de vedere al așezării genelor corespunzătoare unor polipeptide analoage sub aspect funcțional. Astfel, la capătul 3′ al paramyxovirusului prima genă codifică polipeptidul nucleocapsidei, gena virală cea mai puternic exprimată în celulele infectate. Următoarea genă este NS la VSV și N la NDV; polipeptidul N poate exista în forme fosforilate multiple și are un rol parțial stabilit în reglarea sintezei ARN (Chinchar și Portner, 1981; Samson și colab., 1981). Ca abundență celulară, proteina virală N este a doua și se asociază tranzitoriu cu nucleocapsida (Portner și Kingsbury, 1976).

Următoarea genă a paramyxovirusurilor este F_0, care controlează fuziunea și hemoliza și care nu are corespondent în genomul VSV.

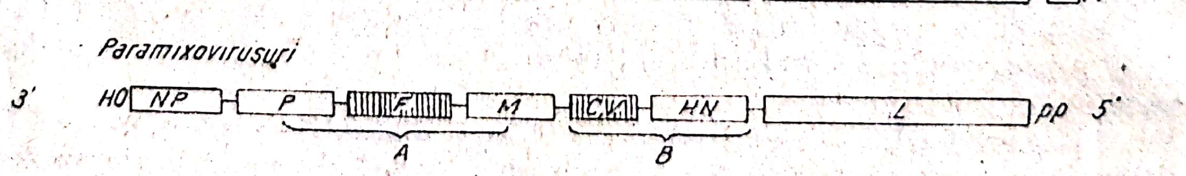


Fig. 6-26 — Organizarea genomului paramyxovirusurilor (NDV), comparativ cu cel al rhabdovirusurilor (VSV), cu alinierea echivalențelor funcționale ale produselor genelor.

▥ — gene NDV fără echivalent în genomul VSV; *A* și *B* — regiuni cu anomalii de transcriere (după Collins și colab., 1980; Ball și White, 1976).

Urmează gena proteinei M, de mare importanță pentru ambele virusuri în asamblarea și înmugurirea virionului matur și care poate fi fosforilată (Yoshida și colab., 1979). Între M și HN a fost plasată gena pentru proteina paramyxovirală nestructurală C a NDV sau B a virusului Sendai (avînd o masă moleculară de 22 000 daltoni) (Etkind și colab., 1980 ; Peluso și colab., 1977), deși din alte lucrări reiese că această proteină virală nestructurală este tradusă de pe ARNm al N, într-o altă citire ; această anomalie nu a fost încă explicată.

Deși din punct de vedere funcțional glicoproteina HN paramyxovirală este mult mai complexă, ea poate fi considerată echivalentul glicoproteinei G din VSV. HN, cu funcții hemaglutinantă și neuraminidazică, interacționează cu M în asamblarea virusului (Yoshida și colab., 1979). Oricum, încorporarea unor activități atît de diverse pe aceeași proteină, deci pe același suport material, ilustrează modul foarte economic în care este utilizată informația limitată a genomului.

Ultima genă din genomul ambelor virusuri codifică o proteină cu masă moleculară mare, probabil cu rol multifuncțional, implicată în sinteza ARN, ca și în poliadenilarea și *capping*-ul său (Choppin și Compans, 1975).

Pe baza evidentelor asemănări de organizare a genomurilor VSV și NDV s-a sugerat că ambele ar proveni de la un virus ancestral, genomul rhabdovirusurilor formîndu-se prin deleție. De altfel, și compararea secvențelor nucleotidice de la capetele 3′ ale VSV și Sendai (fig. 6-27) arată identitatea a opt nucleotide din nouă, iar în continuarea lor se află o catenă oligopirimidinică de 7—10 reziduuri nucleotidice. De asemenea, la capătul 5′ identitatea se regăsește la opt nucleotide din nouă. În plus, Gupta și Kingsbury (1982) au sesizat și alte similitudini evidente : cinci din genele virusului Sendai se termină cu aceeași secvență 3′-AUUC(U_5)-5′, analoagă secvenței 3′-AUAC(U_7)-5′ de la VSV. Acest tip de comparații va fi cu atît mai interesant, cu cît se vor efectua pe secvențele de aminoacizi descifrate ale proteinelor virale corespunzătoare celor două virusuri.

Replicarea ARN. Despre replicarea genomului paramyxovirusurilor se cunosc destul de puține lucrări. Din celulele infectate s-a putut izola un ARN „+“ de 50 S, posibila matriță de replicare a ARN viral, dar, cel mai adesea, aceste molecule sînt asociate nucleocapsidei și rareori se găsesc libere (Kingsbury, 1977), ca și la rhabdovirusuri.

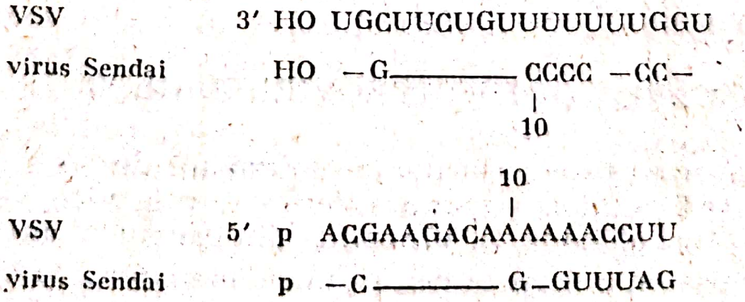


Fig. 6-27 — Capetele 3′ și 5′ ale ARN de rhabdovirusuri (VSV) și paramyxovirusuri (virus Sendai), cu alinierea secvențelor omoloage (după Rowlands, 1979 ; Lazzarini și colab., 1981).

Asemănător cu cele găsite la alte virusuri cu ARN cu catenă negativă și la paramyxovirusuri s-a constatat o ușoară complementaritate a capetelor 3′ și 5′ (Lazzarini și colab., 1981), ceea ce sugerează că centrele de recunoaștere pentru transcriptază/replicază pe ambele catene sînt înrudite și că ar putea fi vorba de una și aceeași enzimă.

Strategia de traducere. Modificările posttranslaționale ale proteinelor structurale ale paramyxovirusurilor au un rol deosebit în maturarea virionilor respectivi. Astfel, polipeptidul factorului de fuziune este tradus ca precursor F_0 care se glicozilează și este transportat apoi spre suprafața celulei. În celulele permisive forma F_0 inactivă este scindată la forma activă F, necesară pentru fuziune. În celulele nepermisive, virionii eliberați conțin F_0, care se poate activa prin adăugare de tripsină sau chimotripsină (Scheid și Choppin, 1976).

Și HN este produs ca precursor HN_0, cu masa de 82 000 daltoni, care pierde apoi o secvență de aminoacizi, cu formarea polipeptidului activ, cu masa de 75 000 daltoni (Nagai și colab., 1976 ; Garton și colab., 1980). S-ar putea ca, intracelular, atît F_0, cît și HN_0 să fie hidrolizate de o protează din aparatul Golgi, care mai participă și la *processing*-ul altor peptide virale.

Formele inactive F_0 și HN_0 pot fi utilizate la asamblarea virionilor, dar aceștia își pierd virulența (Nagai și colab., 1976).

Asamblarea și eliberarea paramyxovirusurilor. Asamblarea paramyxovirusurilor a fost intens studiată de către Choppin și colaboratorii săi (Choppin și colab., 1971 ; Compans și Choppin, 1971). Glicoproteinele virale de înveliș, prelucrate sau nu, sînt încorporate în membrana citoplasmatică, căpătînd aspectul cunoscut de proiecții ; partea internă a membranei este apoi căptușită cu polipeptidul-*matrix* M, căruia ulterior i se asociază și nucleocapsida. Acolo unde au avut loc toate aceste trei evenimente se înregistrează înmugurirea virionilor paramyxovirali. Uneori se pot constata în celulele infectate acumulări de nucleocapsidă în exces, fenomen invers proporțional cu randamentul în virioni infectanți. În linii mari, asamblarea paramyxovirusurilor se aseamănă cu cea a rhabdovirusurilor, urmînd etapele generale ale procesului la virusurile ARN cu înveliș și avînd proteină-*matrix*.

Alterări ale metabolismului celular. De obicei, paramyxovirusurile nu produc modificări dramatice ale sintezei macromoleculelor celulare, iar în cazul unor infecții persistente producția de virus are loc în paralel cu supraviețuirea celulelor respective.

6.3.6. REPLICAREA ORTHOMYXOVIRUSURILOR

Familia ortomyxovirusurilor este formată din trei grupuri de virusuri, între care s-au înregistrat diferențe antigenice : grupul gripei A, cel al gripei B și al gripei C. Virusurile din grupul A sînt patogene pentru om, pentru păsări, precum și pentru unele mamifere, în timp ce virusurile gripale B sînt infectante în special pentru specia umană (Matthews, 1982). Despre virusurile gripale C se cunosc date puține, dar se știe că pentru om sînt slab patogene. Atît virusurile gripale A, cît și cele B suferă în timp modificări antigenice lente *(antigenic drift)*, dar numai virusurile gripale A prezintă schimbări bruște antigenice *(antigenic shift)*, care conduc la apariția unor noi tulpini de virus, cu markeri de suprafață total diferiți de cei care existaseră la tulpinile virale anterioare ; aceste modificări rezultă prin recombinările intervenite între tulpinile gripale animale și cele umane, sau numai între tulpinile umane.

Virionii gripali au în general dimensiuni de 80—120 nm și constau dintr-un număr variabil (în funcție de grup) de fragmente ribonucleoproteice, încapsidate într-un înveliș lipoproteic căptușit în interior de proteina-*matrix* M și din care spre exterior se proiectează două tipuri de peplomere cu activitate hemaglutinantă și respectiv neuraminidazică (Nayak, 1977). Hemaglutinina se prezintă sub forma unor baghete de circa 14 nm lungime, cu un diametru de 4 nm și avînd un capăt hidrofob incrustat în stratul lipoproteic și un capăt hidrofil orientat spre mediul exterior, înconjurător. Neuraminidaza are un aspect oarecum asemănător unei ciuperci, cu un capăt de 8,5×5 nm, pe un picior de 10 nm și terminat în stratul lipoproteic printr-un nod de 4 nm diametru (Laver și Valentine, 1969).

Genomul virusurilor gripale A constă din opt segmente de ARN cu catenă negativă care au în total 13 500 de nucleotide, cu o masă de $4{,}5\times10^6$ daltoni ; fiecare segment de genom este complexat cu polipeptidul NP de nucleocapsidă și cu componentele P1, P2, P3 cu rol de transcriptaze/replicaze (Rees și Dimock, 1981). Virionii gripali din grupul B au o arhitectură similară (Racaniello și Palese, 1979), pe cînd cei din grupul C prezintă o construcție diferită. Petrie și colab. (1979) au constatat că în virionii gripali C se află nouă segmente de ARN, iar din alcătuirea lor lipsește neuraminidaza, pe suprafața lor existînd doar o singură specie glicoproteică, corespunzătoare hemaglutininei (Herrler și colab., 1981).

În linii mari, replicarea virusurilor gripale se aseamănă celei a altor virusuri cu catenă ARN negativă. Nucleocapsida, spre deosebire de ARN total deproteinizat, poate iniția infecția, reliefînd faptul că polimerazele asociate nucleocapsidei sînt necesare pentru transcrierea primară a ARN. Studii relativ recente au arătat că există două populații de ARN complementar. O primă categorie include ARNm care nu sînt transcripți compleți ai ARN viral și care prezintă structuri 5′-cap și 3′-poliA ; aceste specii apar atît în urma transcrierii primare, cît și la transcrierea secundară. A doua categorie este reprezentată de un ARN complementar matriță, un transcript complet căruia îi lipsește secvența 3′-poliadenilată, dar care la capătul 5′ are un pppA ; acest transcript servește drept matriță pentru replicarea ARN genomic (Smith și Hay, 1981 ; Hay și colab., 1982).

Cu excepția celor mai mici segmente de ARN genomic gripal, care codifică fiecare cîte două polipeptide, toate celelalte fragmente de genom constituie gene ca atare, codificînd cîte un singur polipeptid viral specific. Cunoștințele actuale asupra genelor virusurilor gripale au fost obținute prin coroborarea a diferite metode de analiză a unor recombinanți (printre care electroforeza în gel de poliacrilamidă a polipeptidelor, corelată cu electroforeza genelor) sau prin tehnici de stopare a translației *in vitro*, prin diverse procedee de hibridizare. Prima metodă menționată se bazează pe faptul că la numeroase tulpini de virusuri gripale A, cele opt segmente ale ARN pot fi bine rezolvate și definite prin electroforeză ; pe baza masei lor moleculare se face ulterior identificarea produselor lor de exprimare ca polipeptide. Cele opt segmente ale ARN gripal identificate sînt următoarele (în ordinea descrescîndă a dimensiunii lor, apreciată pe baza numărului de nucleotide componente) : gena 1 (2 341 de nucleotide) codifică polimeraza P3 ; gena 2 (2 341) codifică polimeraza P1 ; gena 3 (2 233) — pentru polimeraza P2 ; gena 4 (1 756) — pentru hemaglutinina HA ; gena 5 (1 565) — pentru proteina NP a nucleocapsidei ; gena 6 (1 413) — pentru neuraminidaza NA ; gena 7 (1 027) — pentru proteina-*matrix* M ; gena 8 (890) — pentru proteinele virale nestructurale NS1 și NS2 (Palese, 1977 ; Lamb și Lai, 1980 ; Winter și Fields, 1981, 1982 etc.).

Dacă două tulpini diferite de virus gripal infectează una și aceeași celulă, prin rearanjarea segmentelor de genom apar cu o mare frecvență noi variante (recombinanți) de virusuri gripale (Palese, 1977 ; Scholtissek, 1979) ; comparînd recombinanții formați între aceiași parentali în diverse condiții, devine posibilă corelarea funcției cu prezența anumitor gene.

Strategia de transcriere. O serie de experimente au arătat un fapt cu totul deosebit : virusurile gripale nu se pot replica în celulele enucleate și nici în celulele tratate cu actinomicină D (în stadiile timpurii ale infecției), ceea ce le deosebește de alte familii de virusuri ARN (Kelly și colab., 1974). Nucleul celular s-a dovedit a fi esențial pentru stadiile timpurii ale infecției gripale, enuclearea la 4 ore de la infecție permițînd totuși apariția unor titruri scăzute de virus infectant (Pennigton și Pringle, 1978). S-ar părea că în aceste stadii ale replicării virusului gripal intervine — într-un mod rămas încă obscur — ARN polimeraza II ADN-dependentă celulară.

Herz și colab. (1981) au arătat că transcrierea primară, ca și cea secundară a genomului gripal, are loc în nucleul celular, iar polipeptidele gripale nou-sintetizate — structurale și nestructurale (P1, P2, P3, NP, M și NS1) — sînt transportate la nucleu de la sediile sintezei lor citoplasmatice (Briedis și colab., 1981), în scopul formării unor complexe de transcriere și mai eficiente.

Strategia de transcriere a ARN din virusurile gripale le deosebește de alte virusuri cu catenă ARN negativă. Analiza mesagerilor izolați din celulele infectate a arătat că la capătul 5′ ei prezintă o structură specifică de forma m^7GpppAmpX, urmată de 9—15 nucleotide care nu există în ARN viral. Acest fapt a dus la presupunerea că întreaga structură de mai sus, care ar putea avea rol de amorsă în transcriere, este donată mesajelor virale de către ARN celular (Krug și colab., 1979 ; Caton și Robertson, 1980). La hidroliza secvenței celulare respective pare să participe o endonuclează codificată de către virus. Lucrările lui Ulmanen și colab. (1981) au stabilit că polipeptidul P3 (componentă a polimerazei gripale) recunoaște structura 5′-cap de mai sus, căreia i se asociază pe toată durata transcrierii mesajului.

Transcrierea este inițiată de atașarea unui reziduu de G la amorsă, reacție reclamată de polimeraza P1, responsabilă de inițiere (Ulmanen și colab., 1981). Apoi transcriptaza copiază exact genomul viral, pînă cînd întîlnește o secvență de 5—7 resturi de uracil, așezate la circa 20 de nucleotide de capătul 5′ al respectivului segment de genom ; în această zonă complexul enzimatic are o „ezitare“, care se traduce prin poliadenilarea capătului 3′ al transcriptului și terminarea transcrierii (Robertson și colab., 1981).

Cei opt transcripţi astfel sintetizaţi pot fi traduși la polipeptidele virale corespunzătoare ; de menţionat că genele 7 și 8 dau naștere fiecare la cîte două polipeptide, cu implicarea probabilă a unor enzime celulare nucleare (Lamb și Lai, 1980). În general, viteza de transcriere este aceeași pentru toate cele opt segmente de ARN.

Replicarea ARN. Spre deosebire de transcriere, care deosebește orthomyxovirusurile de celelalte virusuri cu catenă ARN negativă, replicarea se petrece la fel cu a celorlalte virusuri. Se cunosc relativ puține amănunte ale procesului, dar se poate presupune că, întrucît toate cele opt segmente de ARN gripal au aceeași secvență 3′ (fig. 6—28), de 12—17 nucleotide,

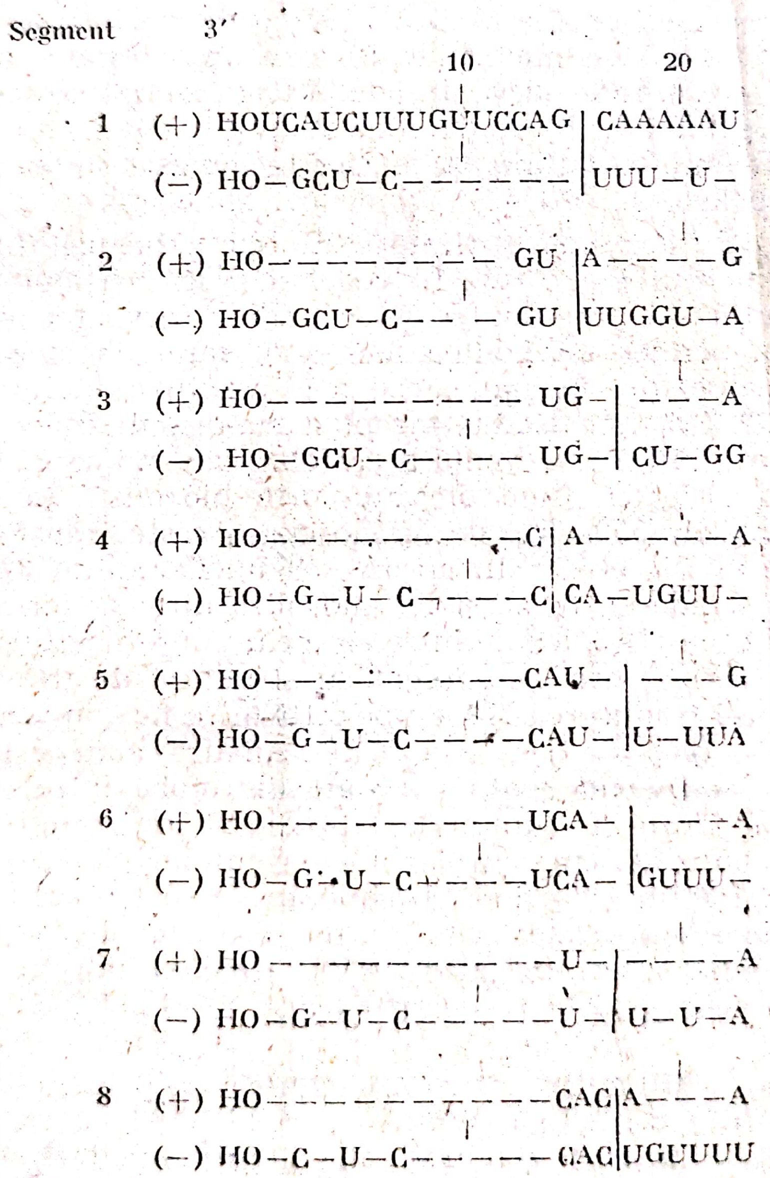

Segment
3′
10
20
1 (+) HOUCAUCUUUGUUCCAG CAAAAAU
(–) HO–GCU–C––––––– UUU–U–
2 (+) HO–––––––––– GU A––––G
(–) HO–GCU–C––– – GU UUGGU–A
3 (+) HO–––––––––– UG– –––A
(–) HO–GCU–C–––– UG– CU–GG
4 (+) HO–––––––––––C A––––––A
(–) HO–G–U–C–––––C CA–UGUU–
5 (+) HO–––––––––CAU– –––G
(–) HO–G–U–C––––CAU– U–UUA
6 (+) HO––––––––––UCA– –––A
(–) HO–G–U–C–––––UCA– GUUU–
7 (+) HO–––––––––––––U– ––––A
(–) HO–G–U–C––––––U– U–U–A
8 (+) HO––––––––––––CAC A–––A
(–) HO–C–U–C––––––GAC UGUUUU

Fig. 6-28 — Secvenţele de terminare ale celor opt segmente de ARN gripal (pesta aviară) ; sînt prezentate capetele 3′ ale genomului și antigenomului.
Liniile orizontale — identitatea nucleotidelor ; *liniile verticale* — locurile de divergenţă ale secvenţei (după Robertson, 1979).

aceasta ar putea servi ca centru de legare a aceleiași replicaze virale. În plus, la capetele 5′, ARN viral conține secvențe parțial complementare. S-ar putea ca replicarea ARN viral să fie sub controlul acestor zone din catenele respective.

Cele opt segmente se replică independent. Pentru moment, sediul replicării nu se cunoaște cu precizie, dar se poate presupune că se află tot în nucleul celular, ca și cel pentru transcriere (Herz și colab., 1981).

Strategia de traducere. Prin clonare genică s-a reușit în ultima vreme descifrarea structurii primare complete a genelor virusurilor gripale, ceea ce permite deducerea secvenței aminoacizilor din polipeptidele corespunzătoare.

Transcrierea și traducerea genelor 1, 3, 4, 5 și 6 (fig. 6—29) prezintă o serie de asemănări. Fiecare ARNm mai are, în plus față de structura 5′-cap cu rol de primer transferată de la ARNm de gazdă și așezată după ea, și o zonă de 20—45 de nucleotide 5′ care nu se traduc, după care urmează codonul de inițiere, secvența „de citit“, codonul de terminare, o nouă zonă intraductibilă de 4—40 de nucleotide și capătul 3′-poliadenilat. În transcripții ARNm, reamintim, nu se găsește zona secvenței comune 5′, care conține 16 nucleotide.

Proteina gripală cea mai studiată este cea a hemaglutininei HA, codificată de segmentul 4 al ARN. În vederea explicării *drift*-ului antigenic și a *shift*-ului s-a procedat la determinarea secvenței nucleotidice a ARN respectiv, pentru a se putea face apoi corelația cu eventualele modificări ale compoziției în aminoacizi a glicopolipeptidului corespunzător. Polipeptidul HA este tradus începînd cu primul codon AUG din ARNm. El prezintă inițial o secvență hidrofobă, care nu se mai regăsește în HA matură din virion, fiind pierdută prin hidroliză. În continuare urmează o secvență de 550—570 de aminoacizi. Aceste transformări sînt redate schematic în fig. 6—29. În apropierea nucleotidului 326 se află un alt centru de scindare ; în acest loc hidroliza duce la formarea celor două segmente HA1 și HA2, legate între ele prin punți disulfurice. Hemaglutinina gripală activă este un agregat cu structură de trimer (Wilson și colab., 1981). Deci traducerea HA de pe ARNm se face în sensul NH_2—secvență-semnal — HA1 — HA2 — COOH. Analiza aminoacizilor HA1 a arătat că acest polipeptid conține o zonă hidrofobă între aminoacizii 185—211, probabil fixată în dublul strat lipidic al învelișului viral, precum și un capăt hidrofil scurt. În cazul unor tulpini patogene de pestă aviară, scindarea HA în cele două fragmente se realizează la aparatul Golgi, sub acțiunea proteazelor sale, la fel ca și la alte virusuri. S-a făcut o corelație între susceptibilitatea HA la ruperea hidrolitică și patogenicitatea virusurilor gripale respective (Rott, 1979 ; Klenk și colab., 1980).

O altă proteină gripală care a suscitat interes este polipeptidul nucleocapsidei NP, codificat de ARN5 (Winter și Fields, 1981) (vezi fig. 6-29). ARNm corespunzător prezintă o scurtă zonă 5′ netraductibilă, o zonă deschisă de codificare de 1 400—1 500 de nucleotide și din nou o zonă intraductibilă 3′. Polipeptidul NP are un caracter bazic, așa cum era de așteptat, dată fiind complexarea sa cu ARN viral, pentru formarea nucleocapsidei.

Segmentul 6 al ARN constituie gena pentru neuraminidază ; în cazul a două tulpini de tip N1 de virus gripal, acestei gene i s-a determinat secvența în întregime (Fields și colab., 1981). În celulele infectate cu virusuri gripale nu s-a putut detecta un precursor al acestei glicoproteine. Centrii de glicozilare ai polipeptidului se află localizați în zona NH_2-terminală (vezi fig. 6—29). Se presupune că regiunea cuprinsă între 7—35 aminoacizi este răspunzătoare de asocierea cu membranele lipoproteice. Acționînd asupra virionului gripal, pronaza eliberează tetrameri de neuraminidază, cărora le lipsește însă capătul N-terminal, în timp ce capătul C-terminal rămîne intact.

În ceea ce privește segmentele de genom 7 și 8, situația este mult mai complicată, deoarece fiecare din acești doi ARN codifică două proteine, traduse fiecare de pe alt mesager. Din celulele infectate s-au izolat trei ARNm care pot hibridiza cu segmentul 7. Cel mai mare mesager din cei trei are 1 005 nucleotide, adică întreaga capacitate de codificare a segmentului respectiv, iar prin traducere sintetizează proteina-*matrix* M a virionului cu cei 252 de aminoacizi ai săi. Ceilalți doi ARNm sînt mult mai mici, de 319 și respectiv 278 de nucleotide (Lamb și colab., 1981). Și în moleculele acestor mesageri s-au identificat zone care nu se traduc la proteine. Produsul de exprimare a ARNm de 322 de nucleotide s-a putut identifica în celulele infectate, pe cînd ARNm de 278 de nucleotide nu i s-a atribuit deocamdată un polipeptid corespunzător.

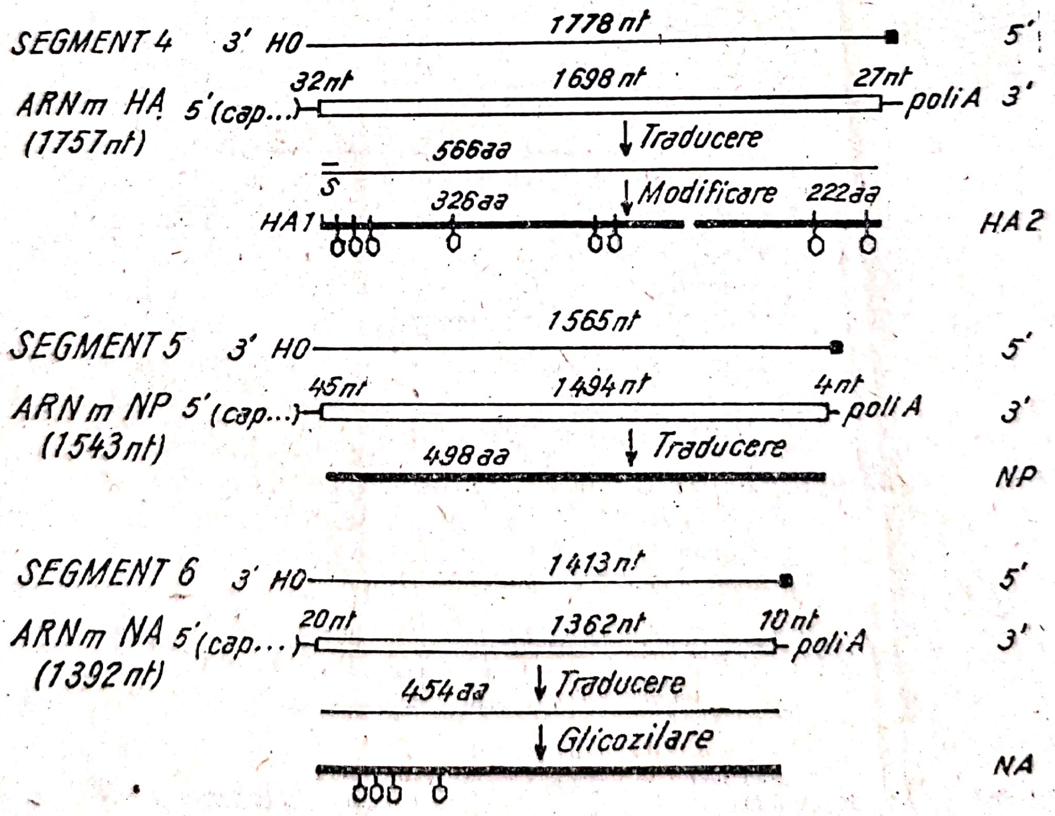

SEGMENT 4
3' HO
1778 nt
5'
ARNm HA
(1757 nt)
5'(cap...)
32 nt
1698 nt
27 nt
poli A
3'
Traducere
566 aa
S
Modificare
326 aa
222 aa
HA1
HA2
SEGMENT 5
3' HO
1565 nt
5'
ARNm NP
(1543 nt)
5'(cap...)
45 nt
1494 nt
4 nt
poli A
3'
498 aa
Traducere
NP
SEGMENT 6
3' HO
1413 nt
5'
ARNm NA
(1392 nt)
5'(cap...)
20 nt
1362 nt
10 nt
poli A
3'
454 aa
Traducere
Glicozilare
NA

Fig. 6-29 — Transcrierea, traducerea și prelucrarea produselor genelor 4, 5 și 6 din virusurile gripale.

S — secvența-semnal a HA (17 nucleotide) ; ⬡ — glicozilarea la centrii indicați (după Winter și Fields, 1981 ; Strauss și Strauss, 1983) (detalii în text).

Compararea polipeptidelor de matrice dintr-un virus gripal de tip H1N1 cu M dintr-un alt tip de virus gripal (H3N2) a arătat conservarea secvenței de aminoacizi (s-au descifrat doar șapte modificări la 252 de aminoacizi). Mesagerul de 1 005 nucleotide prezintă mai multe variații, putîndu-se pune în evidență 10 modificări la 97 de aminoacizi (Lamb și Lai, 1981) (fig. 6—30).

Segmentul 8 al genomului este cel mai mic și este cel care codifică proteinele nestructurale NS1 și NS2, singurele proteine gripale a căror sinteză se află sub control temporal. NS1 este o proteină timpurie, un produs de transcriere primară, care migrează la nucleu unde este direct implicat, într-un mod necunoscut, în replicarea ARN viral. NS2 apare mult mai tîrziu în cursul infecției, dar numai în absența sintezei proteinelor de gazdă. Strategia de traducere a acestei gene este asemănătoare cu cea prezentată la gena 7. Astfel, ARN viral corespunzător are 890 de nucleotide, iar mesajul pentru NS1 este un transcript aproape integral, cu excepția ultimelor 22 de nucleotide 5′ ale parentalului ; acest ARNm are structuri 5′-cap și 3′-poliA. Mesajul pentru NS2 este mai scurt, cu doar 396 de nucleotide, care se suprapun parțial peste cele ale lui NS1. Zonele nucleotidice care codifică fie numai pentru NS1, fie numai pentru NS2 înregistrează mai multe modificări de secvență decît zona citirilor suprapuse, mai bine conservată (Baez și colab., 1981).

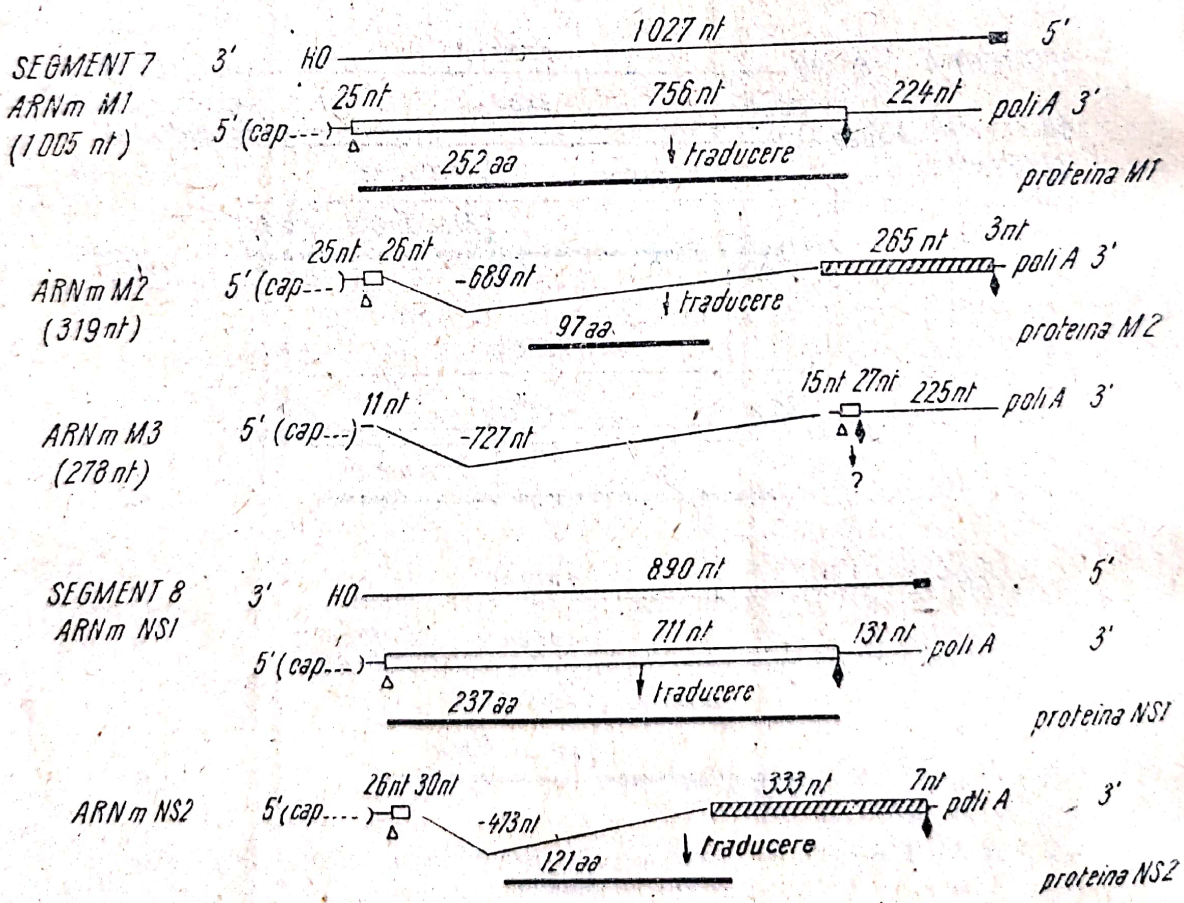

SEGMENT 7
3′
HO
1027 nt
5′
ARNm M1
(1005 nt)
5′ (cap---)
25 nt
756 nt
224 nt
poli A 3′
252 aa
traducere
proteina M1
ARNm M2
(319 nt)
5′ (cap---)
25 nt
26 nt
-689 nt
265 nt
3 nt
poli A 3′
traducere
97 aa
proteina M2
ARNm M3
(278 nt)
5′ (cap---)
11 nt
-727 nt
15 nt 27 nt
225 nt
poli A 3′
?
SEGMENT 8
ARNm NS1
3′
HO
890 nt
5′
5′ (cap---)
711 nt
131 nt
poli A
3′
237 aa
traducere
proteina NS1
ARNm NS2
5′ (cap----)
26 nt 30 nt
-473 nt
333 nt
7 nt
poli A
3′
121 aa
traducere
proteina NS2

Fig. 6-30 — Transcrierea și traducerea genelor 7 și 8 din virusurile gripale. △ — codonii de inițiere AUG ; ♦ — codonii de terminare ; ▨ — citire în alt cadru (cu suprapunere) (după Strauss și Strauss, 1983) (detalii în text).

Diferitele proteine gripale sînt sintetizate în proporții moleculare diferite, dar nu se știe încă mecanismul modulării lor cantitative.

Asamblarea și eliberarea orthomyxovirusurilor. Asamblarea virionilor gripali coincide cu eliberarea lor din celulă prin înmugurire. Pe suprafața celulelor infectate cu virusuri gripale se disting proiecțiile glicoproteinelor de suprafață în regiunile respective ; în interiorul celulelor se regăsește proteina-*matrix* M. Acestor zone ale membranei citoplasmatice li se asociază ulterior și ribonucleoproteina, iar apoi are loc înmugurirea.

Ribonucleoproteina gripală izolată din celulele infectate se află sub forma unor fragmente corespunzătoare clasei de ARN pe care o conține, cu aspectul unor duble elice, cu o buclă la unul din capete. Aranjarea într-un singur virion a cîte unui singur set complet de segmente de ARN complexate cu proteina reprezintă un moment-cheie în asamblarea virionilor gripali.

Alterări ale metabolismului celular. La circa două ore de la infecție se poate observa, în unele cazuri, o scădere a sintezei macromoleculelor celulare, alteori fenomenul se înregistrează cu întîrziere, dar în ambele cazuri răspunzătoare sînt proteinele virale, și anume cele nestructurale NS1 și NS2.

6.3.7. REPLICAREA ARENAVIRUSURILOR

Din familia *Arenaviridae* fac parte o serie de virusuri a căror gazdă primară este de obicei o specie de rozătoare, cărora le provoacă maladii cronice. Transmiterea virusurilor respective la om poate duce la boli cu urmări fatale (febre hemoragice, meningite aseptice). Din punct de vedere serologic se deosebesc două grupuri : cel al arenavirusurilor din Lumea Veche (virusul coriomeningitei limfocitare, virusul febrei de Lassa etc.) și grupul arenavirusurilor din Lumea Nouă (virusul Junin al febrei hemoragice de Argentina, virusurile Tacaribe, Pichinde etc.) (Matthews, 1982 ; Pederson, 1979).

Ceea ce caracterizează arenavirusurile este structura genomului lor ARN cu catenă negativă segmentată. Virionii au dimensiuni variabile de 60—300 nm și conțin cinci specii de ARN, din care trei sînt de origine celulară (ARN ribozomali 18 S și 28 S, alături de molecule mici, de 4—5 S). ARN viral propriu-zis este reprezentat de două molecule : una mare L (cf. engl. *large* = mare) de 23 S, cu număr variabil de nucleotide (6 300—8 400) cu masa moleculară de $2,1—2,8 \times 10^6$ daltoni, în funcție de tulpina de virus, și o moleculă mică S (cf. engl. *small* = mic) de 3 000—3 900 de nucleotide, cu masă moleculară de $1,1—1,3 \times 10^6$ daltoni (Rawls și Leung, 1979 ; Ramsinghi și colab., 1980).

În particula virală matură, cu înveliș, se înglobează și ribozomi celulari, ceea ce conferă arenavirusurilor un aspect nisipos (care le-a dat și numele) la microscopul electronic, dar aceste formațiuni nu sînt necesare pentru exprimarea infectivității, după cum au arătat lucrările lui Leung și Rawls (1977). Nucleocapsida virală este insuficient caracterizată, dar unele studii indică existența unei structuri discrete ce poate fi disociată în mici formațiuni cu aspect asemănător nucleozomilor (Vezza și colab., 1978 ; Young și colab., 1981). În exterior, arenavirusurile prezintă o serie de proiecții glicoproteice care proemină din dublul strat lipidic al învelișului. Electroforeza în gel de poliacrilamidă a permis întrucîtva caracterizarea proteinelor structurale ale arenavirusurilor. Specia polipeptidică majoră o constituie polipeptidul nucleocapsidei, cu o masă moleculară de 63—72 000 daltoni. În funcție de virus s-au mai identificat și una-două glicoproteine ; virusul coriomeningitei linfocitare sau cel Pichinde au două glicoproteine cu masa de 34—38 000 daltoni și respectiv 45—70 000 daltoni (Young și colab., 1981), în timp ce virusul Tacaribe, de exemplu, prezintă o singură specie glicoproteică, cu masa de 42—44 000 daltoni (Rawls și Leung, 1979). Rawls și Leung (1979), Young și colab. (1981) și alți autori au mai descris și numeroase componente minore asociate nucleocapsidei sau unele glicoproteine de înveliș. De menționat că antigenele glicoproteice s-au dovedit a fi specio-specifice.

Replicarea ARN al arenavirusurilor este destul de puțin lămurită. Se știe că cele două segmente de ARN genomic, fără structură 5′-cap și 3′-poliadenilată, constituie specii unice, așa cum s-a putut dovedi prin hibridizarea cu ARN complementar (Leung și colab., 1981), fără caracter infectant. ARN izolat din poliribozomii celulelor infectate cu arenavirusuri hibridizează eficient cu ARN genomic, ceea ce a determinat clasificarea acestor virusuri în categoria celor cu catenă ARN negativă. Din virusul Pichinde s-a izolat o activitate ARN polimerazică ARN-dependentă de origine virală, precum și activități de tip poliA și poliU polimerazice, probabil de natură celulară, înglobate în virion (Leung și colab., 1981).

Auperin și colab. (1982) au arătat relativ recent că la cele două catene L și S ale ARN din virusul Pichinde se poate pune în evidență existența unei parțiale identități a capetelor 3′, cu atît mai frapantă cu cît în rest secvențele de nucleotide ale celor două segmente de ARN sînt complet diferite (fig. 6—31). Aceiași autori (Auperin și colab., 1982) au demonstrat și identitatea între secvențele de la capătul 3′ al fragmentului scurt de ARN din virusurile Tacaribe, al coriomeningitei limfocitare și Pichinde, pe de o parte, iar pe de alta asemănările de structură primară între capetele 3′ ale fragmentului mare de ARN din virusurile coriomeningitei limfocitare, Pichinde și Tacaribe. Semnificația conservării acestor secvențe ar putea rezida fie în rolul lor de centri de legare pentru replicază, fie ar putea fi pusă în legătură cu complexarea cu polipeptidul N, pentru formarea nucleocapsidei.

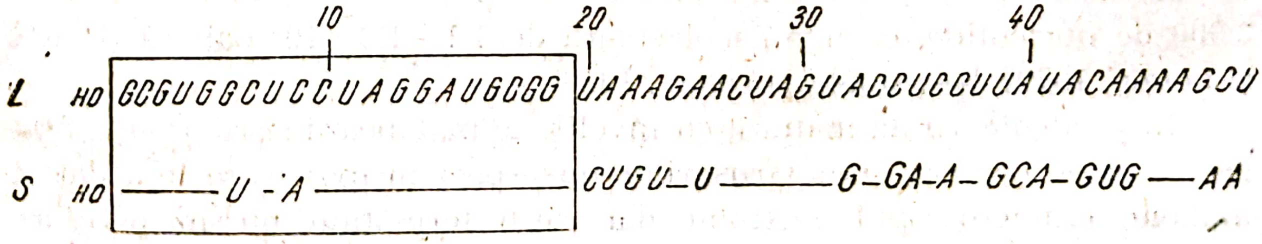

10
20
30
40
L HO GCGUGGCUCCUAGGAUGCGG UAAAGAACUAGUACCUCCUUAUACAAAAGCU
S HO ——U -A —— CUGU_U ——G-GA-A-GCA-GUG ——AA

Fig. 6-31 — Capetele 3′-terminale ale segmentelor ARN din arenavirusuri (virusul Pichinde) (în *casetă* — secvență conservată) (după Auperin și colab., 1982).

Nu se cunosc amănunte în ceea ce privește strategia de transcriere și traducere pentru aceste virusuri. În celulele infectate s-au pus în evidență, ca prime produse de traducere, proteina nucleocapsidei N, alături de unele din produsele sale de degradare.

S-au pus în evidență și unele modificări posttranslaționale ale glicoproteinelor din arenavirusuri. Unul dintre exemplele cele mai clare îl constituie maturarea precursorului glicoproteic gp70 din virusul Tacaribe, cu formarea glicoproteinei virale unice de 42 000 daltoni (Saleh și colab., 1979). În prezent se știe că polipeptidul N al nucleocapsidei și o glicoproteină asociată din virusul Tacaribe sînt ambele codificate de către segmentul S al ARN, dar nu este clar totuși dacă traducerea se face de pe un mesager unic sau de pe mesageri individuali, întrucît nu s-a reușit încă detectarea unui eventual precursor comun al celor două produse virale majore.

Identificarea de către Harnish și colab. (1981) în citoplasma celulelor infectate cu virus Pichinde a unui polipeptid cu masa moleculară mare (200 000 daltoni) a condus la presupunerea că ar fi vorba de replicaza virală, prin analogie cu dimensiunile replicazelor din VSV și NDV. Din celulele infectate cu virus Tacaribe s-au separat prin precipitare cu ser hiperimun două proteine nestructurale NS1 (79 000 daltoni) și NS2 (105 000 daltoni) (Compans și colab., 1981).

Așa după cum s-a menționat mai sus, pe segmentul S al ARN se află genele polipeptidului nucleocapsidei N și ale unei glicoproteine, ceea ce practic saturează capacitatea sa de codificare, de 130 000 daltoni de proteină. Segmentul L are o capacitate de codificare mult mai mare, de 280 000 daltoni ; de pe acest segment se transcriu mesagerii pentru proteina mare, asimilată replicazei. Astfel, s-ar părea că genele structurale se află pe segmentul mic de genom, iar genele replicazei pe segmentul mare.

Există unele indicii că replicarea arenavirusurilor este dependentă de factorii celulari și chiar ar implica și participarea nucleului, ca și la orthomyxovirusuri, dar lucrurile sînt departe de a fi elucidate.

Arenavirionii, de diverse forme și dimensiuni, înmuguresc în acele zone ale membranei plasmatice în care s-au încorporat peplomerele virale : în particulele mature se regăsesc și cîțiva ribozomi din celulele infectate respective.

6.3.8. REPLICAREA BUNYAVIRUSURILOR

Familia *Bunyaviridae* cuprinde numeroase virusuri, clasificate inițial ca arbovirusuri, întrucît majoritatea infectează atît gazde vertebrate, cît și nevertebrate (artropode). Pe baza unor considerații serologice s-a făcut împărțirea membrilor familiei în patru genuri diferite : bunyavirusuri, nairovirusuri, phlebovirusuri, uukuvirusuri.

Virionii acestei familii se prezintă sub forma unor particule sferice cu înveliș de 60—75 nm. Bunyavirusurile au un genom alcătuit din trei segmente de ARN cu catenă negativă, denumite L (*large* ; 7 500—9 000 de baze), M (*medium* ; 5 500—7 00 de baze) și S (*small* ; 900—1 500 de baze). ARN de bunyavirusuri nu are caracter infectant. Nucleocapsida în care se află fragmentele de ARN este cuprinsă într-un înveliș care prezintă proiecții formate din două specii glicopolipeptidice. ARNm de bunyavirusuri din polizomii celulelor infectate se hibridizează cu ARN genomic, ceea ce le-a și atras clasificarea între virusurile cu ARN negativ. Deși amănuntele replicării lor nu se cunosc, se întrevede asemănarea strategiei acestui proces cu acela care se desfășoară la celelalte virusuri cu ARN cu catenă „—“. Organizarea genomului este similară într-o anumită măsură cu cea a arenavirusurilor.

În virionii bunyavirusurilor s-au evidențiat mai multe polipeptide structurale, și anume : N — polipeptidul nucleocapsidei, cu o masă moleculară de 19—26 000 daltoni (mai mult de 2 100 de copii/virion) ; G1 și G2 — glicoproteine aflate fiecare în circa 630 de copii/virion ; componenta minoră L din nucleocapsidă, cu o masă de 120 000—200 000 daltoni și prezentă în 20—25 de copii/particulă virală. În general, mărimea lui G1 este de 85—120 000 daltoni, iar a lui G2 — 30—50 000 daltoni, în funcție de virusul respectiv. Prin traducerea *in vitro* a ARNm corespunzători s-a stabilit că N este codificat de către segmentul cel mai mic de ARN (Gentsch și Bishop, 1979) ; prin eliminare, căci pentru moment nu s-au acumulat alte dovezi, fragmentul mare al genomului ar trebui să-l codifice pe L, alături de alte polipeptide nestructurale minore, observate uneori în celulele infectate (Ushijima și colab., 1981).

Speciile de ARNm complementari segmentelor L și M corespund transcripților integrali ai acestora și par lipsiți de structuri 3′-poliadenilate (Ulmanen și colab., 1981). Nu se știe încă dacă mesagerii respectivi au sau nu structuri 5′-cap. În ceea ce privește mesagerul corespunzător segmentului S de ARN, el pare mai mic decît fragmentul de genom. Analiza secvențelor nucleotidice a permis să se arate că ARNm transcris de pe S este complementar capătului său 3′.

În cazul anumitor bunyavirusuri este posibil ca de pe același segment de genom, în special de pe L și M — deși s-ar părea că au o capacitate limitată de codificare —, să se transcrie și ulterior să se traducă mai multe mesaje, prin citire suprapusă.

Studii de traducere *in vitro* în sistem reticulocitar a ARNm corespunzători segmentului M au permis evidențierea unui precursor glicoproteic de circa 110 000 daltoni, care nu se observă *in vivo*, unde se semnalează doar G1 și G2. De aici s-a tras concluzia că prelucrarea decurge cu o viteză foarte mare (Ulmanen și colab., 1981), deosebit de eficientă chiar în cursul inserării lor în membrană, fapt analog celui constatat la alphavirusuri. Tot segmentul M al ARN mai este responsabil și de codificarea unei proteine nestructurale, cu dimensiuni reduse (masă moleculară 11 000 daltoni) (Fuller și Bishop, 1982). Pentru moment, traducerea ARNm corespunzători segmentului L nu a reușit *in vitro*.

Cercetările de pînă acum, făcute asupra strategiei de traducere a ARNm de bunyavirusuri, nu au făcut decît să arate cît de complicat este acest proces : unele segmente prin transcriere dau naștere la mesageri policistronici, în timp ce altul produce polipeptide diferite prin citiri diferite pe același polinucleotid.

Nici despre sinteza ARNm nu se știe prea multe, dar spre deosebire de cele ce se petrec la orthomyxovirusuri (care au și ele genomul segmentat) nu s-a constatat dependență de funcțiile nucleare, deși în celulele enucleate nu se poate detecta producerea bunyavirusurilor, în pofida faptului că se realizează sinteza tuturor speciilor polipeptidice. S-ar putea ca funcțiile nucleare celulare să intervină doar tîrziu în ciclul replicativ, și anume în cursul etapei de morfogeneză, cu eventuala implicare a membranelor perinucleare (Pennington și Pringle, 1977). Replicarea bunyavirusurilor nu este afectată de prezența α-amanitinei, rifampinei sau actinomicinei D (Bishop și Shope, 1979), ceea ce confirmă independența de nucleul celular.

S-a evidențiat un control temporal al traducerii la polipeptide a mesajelor codificate de bunyavirusuri, cu L și N sintetizate timpuriu (posibilitate de detectare după două ore de la infecție) și cu G1 și G2 ca proteine tîrzii. S-ar putea ca sinteza timpurie de N să fie reclamată de necesitatea formării unor complexe de tip nucleocapsidă cu fragmentul corespunzător de antigenom, complexe active în replicarea ARN. Cea mai mare parte a ARN viral intracelular se găsește sub forma unei ribonucleoproteine conținînd ambele tipuri de catene de ARN „+“ și „—“ într-un raport 1 : 4 (Bishop și Shope, 1979).

Datorită prezenței celor trei segmente de genom, bunyavirusurile intră cu frecvență relativ ridicată în recombinări genetice, dar aceasta se petrece în special în cadrul aceluiași gen și nu între genuri.

În cazul cîtorva bunyavirusuri s-a reușit descifrarea secvențelor nucleotidice de la capătul 3′ al segmentelor de ARN. În toate cazurile studiate s-a remarcat că pe fiecare segment L, M, S de ARN — pentru un virus particular — se conservă o secvență de 11—13 nucleotide, similară în cadrul cîte unui gen. De asemenea, prin stabilirea structurii primare a capătului 5′ al catenelor M și S ale bunyavirusului LaCrosse, s-a observat complementaritatea capetelor 5′ și 3′, ceea ce ar putea corespunde cerințelor de interacțiune a capătului 3′ al ARN cu proteinele virale pentru replicare și transcriere și/sau încapsidare.

6.3.9. REPLICAREA FLAVIVIRUSURILOR

Flavivirusurile sînt virusuri cu înveliș, ai căror virioni sînt constituiți dintr-o nucleocapsidă icosaedrică învelită într-o manta lipoproteică. În capsidă se află genomul ARN cu o lungime de 12 000 de baze, complexat cu o singură specie polipeptidică, desemnată ca V2 sau C, cu masa moleculară de 13 000 daltoni. În învelișul viral s-a identificat o glicoproteină cu masa moleculară de 51—59 000 daltoni, denumită V3 sau E, precum și o proteină asociată neglicozilată cu o masă de 7—8 000 daltoni, notată V1 sau M (Westaway și colab., 1980).

Cu toate că flavivirusurile includ numeroși reprezentanți implicați în patologia umană, ceea ce a făcut să fie destul de studiate, deocamdată biologia moleculară a replicării lor nu este bine înțeleasă, pe de o parte pentru că nu pot fi bine cultivate pe celule, iar pe de alta, deoarece virionii — unii cu potențial înalt patogen — sînt destul de greu de purificat.

Pînă în prezent, s-a reușit identificarea structurii 5′-cap a ARN extras din flavivirusuri stabilindu-se de asemenea absența capătului 3′-

poliadenilat (Wengler și Wengler, 1981), precum și infectivitatea sa. Întrucît nu s-au pus în evidență molecule de ARN de dimensiuni subgenomice, se presupune că unicul mesager este reprezentat de însuși ARN viral. Studiile întreprinse de Westaway (1980) i-au permis să presupună că atît polipeptidele structurale V1, V2, V3, cît și cele nestructurale P20, P27, P37, P71 și P100 sînt inițiate și terminate fiecare separat în cursul traducerii ; acest fapt constituie o caracteristică aparte a flavivirusurilor și le deosebește de ceilalți ARNm de origine animală cunoscuți, care prezintă doar unul-două centre de inițiere a traducerii. Presupunerea se bazează, între altele, pe absența unui polipeptid precursor în cursul unor experimente de marcare în puls. Pe de altă parte, toate polipeptidele flavivirale identificate în celulele infectate sînt distincte și nu prezintă analogii din punct de vedere al structurii lor primare.

Pe baza lucrărilor lui Svitkin și colab. (1981) și Wengler și colab. (1979) s-a elaborat o hartă a organizării genelor în ARN de flavivirusuri, ordinea așezării genelor fiind : 5′-V2-V3-(V1, P20, P27, P37, P71, P100)-3′.

Deocamdată nu se știe nimic despre replicaza flavivirusurilor, dar, deoarece secvențele 5′ și 3′ descifrate ale ARN sînt diferite, se poate presupune că replicazele de pe cele două catene, „+“ și „—“, trebuie să recunoască secvențe deosebite.

6.3.10. REPLICAREA REOVIRUSURILOR

Două genuri de virusuri ale vertebratelor, și anume reovirusurile și orbivirusurile din familia *Reoviridae*, se remarcă datorită genomului lor format din cîteva segmente de ARN bicatenar, fiecare segment reprezentînd o genă aparte. Virionii acestei familii sînt particule sferice, de 75—80 nm, nu au înveliș, au asociată o transcriptază și se multiplică în citoplasmă.

Genomul reovirusurilor are în ansamblu o masă de circa 15 milioane daltoni, gena cea mai mare avînd circa 4 000 de perechi de baze (masa 2,5—3 × 10^6 daltoni), iar cea mai mică are dimensiuni variabile, în funcție de virus, cu o masă de 120 000—600 000 daltoni (ceea ce corespunde la 200—1 000 de perechi de baze). Numărul genelor variază și el, fiind de 10—12 ; rotavirusurile, de exemplu, care cuprind și virusuri patogene pentru om, au 11 gene. Denumirea genelor, precum și a proteinelor codificate de către genele respective a fost propusă de Smith și colab. (1969). Particulele reovirale sînt alcătuite din nouă specii de proteine, repartizate astfel :

— capsida externă este formată din trei specii : majoră μ1C (72 000 daltoni ; 550 de copii/virion) și σ3 (34 000 daltoni ; 900 de copii/virion) (împreună reprezintă circa 60% din masa particulei reovirale) ; minoră σ1 (42 000 daltoni ; 24 de copii/virion) ;

— miezul viral reprezintă cam o treime din masa proteică a particulei virale și conține șase specii de polipeptide : componentele majore λ1 (155 000 daltoni ; 105 molecule/virion), λ2 (140 000 daltoni ; 92 de molecule/virion) și σ2 (38 000 daltoni ; 200 de copii), alături de componentele minore λ3 (135 000 daltoni ; sub 12 molecule/virion), μ1 (circa 20 de copii/virion ; 80 000 daltoni) și $\mu 2$ (70 000 daltoni ; sub 12 molecule/virion).

În plus, genomul mai codifică și proteinele nestructurale μNS și σNS.

Reovirusurile prezintă un mecanism unic de inițiere a funcțiilor lor genetice. ARN dublu-catenar genomic este foarte bine conservat în celule, chiar după o păstrare mai îndelungată, dar el nu este activ ca mesager. În reovirioni există o ARN polimerază ARN-dependentă care face transcrierea segmentelor genomului la ARNm. S-ar părea că, în mod paradoxal (căci conțin RNaze, fosfataze alcaline etc.), sediul sintezei ar fi chiar lizozomii, organite la care are loc decapsidarea în trepte a virionilor. Pe de altă parte, din lizozomi se eliberează, printr-un mecanism parțial cunoscut, particule subvirale (PSV).

Ciclul de replicare. Majoritatea lucrărilor asupra reovirusurilor s-au efectuat cu reovirus de tip 3, crescut pe celule L în suspensie. După infectarea cu o multiplicitate ridicată și trecerea unei perioade de latență de circa 6 ore, începe apariția intracelulară a virusului, iar randamentul maxim de virus se înregistrează după 16—18 ore de la infecție (Silverstein și Dales, 1968). Prin metode convenționale de colorare se pot pune în evidență în zona perinucleară unele incluzii care conțin simultan ARN mono- și bicatenar, precum și proteine capsidale și virioni.

Inițierea infecției. Virionii reovirali se leagă la receptorii membranei celulare prin interacțiune cu polipeptidul $\tau 1$ localizat pe capsida exterioară, și apoi intră în celulă prin viropexie. S-a observat că pătrunderea reovirionilor în celulele HeLa, de exemplu, este inhibată de către polimerii cationici, cum ar fi DEAE-dextranul, dar mecanismul de producere a acestei inhibiții nu este deocamdată explicat. Vacuolele fagocitare care conțin virionii pătrund în interiorul celulelor, unde fuzionează cu lizozomii. Cele două faze — viropexia și fuziunea — decurg foarte rapid, după 60 de minute de la inoculare virionii putînd fi deja găsiți în lizozomi unde suferă procesul de decapsidare cu ajutorul enzimelor hidrolitice. Borsa și colab. (1979) au arătat că reovirusurile pot pătrunde în celulă și direct prin membrană, fără fagocitoză.

Decapsidarea reovirusurilor are loc în două etape distincte. În prima etapă, care depinde de proteoliza particulelor respective, se formează particule subvirale intermediare (PSVI), iar cea de-a doua etapă — independentă de proteazele exogene, dar posibil dependentă de o enzimă endogenă neidentificată ca atare — are drept rezultat apariția particulelor subvirale. Capacitatea reovirusurilor de a utiliza pentru decapsidare lizozomii este unică între virusurile animale, deoarece celelalte virusuri sînt complet distruse de hidrolazele lizozomale (Silverstein, 1975), contribuind astfel la apărarea celulei.

Activarea transcriptazei asociate virionilor. Deoarece ARN bicatenar nu poate îndeplini funcția de mesager, s-a pus problema mecanismului prin care se realizează funcțiile genetice ale reovirusurilor. Prin experimente cu actinomicină D, care inhibă sinteza ARN celular prin blocarea ARN polimerazelor ADN-dependente, s-a dovedit că transcrierea

ARN reoviral nu depinde de gazdă. De altfel, în virionii REO purificați s-a identificat o transcriptază, care acționează în sensul transcrierii unor ARN monocatenari de pe genomul bicatenar. În miezul particulelor reovirale s-au mai găsit asociate și alte activități enzimatice (nucleozidtrifosfathidrolază, pirofosfatază GTP-dependentă, una-două ARN metilaze, guaniltransferază), care permit miezului nu numai să transcrie segmentele genomului, dar să le adauge și structura 5′-cap ; în această activitate par implicate proteinele $\lambda 2$, cu activitate metiltransferazică, situată în afara miezului, la ieșirea celor 12 proiecții tubulare, și $\lambda 1/\lambda 1c$ cu rol de guaniltransferază.

Activitatea transcriptazică este reglată de către proteinele externe ale capsidei virale. Decapsidarea la PSV, prin pierderea $\sigma 3$ și hidroliza proteinei $\mu 1C$ la proteina σ cu masa de 65 000 daltoni, produce activarea transcriptazei ; se pare că rolul major de reglare îi revine lui $\sigma 3$. Activitatea transcriptazică propriu-zisă a fost asociată proteinei minore de miez $\lambda 3$. S-a avansat chiar ideea că fiecare segment de ARN reoviral, deci fiecare genă, ar fi transcrisă de una din cele 12 copii de $\lambda 3$ din miez. Transcripții primari nascenți ar putea fi excluși din miez prin intermediul celor 12 proiecții cilindrice, tubulare ale miezului ; la suprafață, transcripții ar suferi modificările posttranslaționale necesare.

Reacția de transcriere catalizată de transcriptaza reovirală este conservativă, întrucît în produsele de transcriere nu au fost niciodată regăsite catene parentale (Skehel și Joklik, 1969), deci este un proces asimetric. Toate segmentele ARN se transcriu cu aceeași viteză.

Transcrierea genomului reoviral se desfășoară în două etape, una timpurie și alta tîrzie. Cele două clase de ARN astfel formați pot fi definiți prin momentul sintezei lor, prin tipul de particule care îi sintetizează, precum și prin natura capătului lor 5′. ARNm transcriși timpuriu de către transcriptaza asociată PSV parentale au structură 5′-cap. La 12 ore după infecție, sinteza lor încetează, probabil din cauza reasamblării capsomerelor externe. Numai acești transcripți cu structură 5′-cap pot fi folosiți ca matriță pentru sinteza catenelor „—" (Furnichi și colab., 1975), deci pentru replicare. De aici rezultă că ei au o funcție dublă, servind atît ca mesageri pentru sinteza proteică, cît și ca matriță de replicare a genomului.

ARNm reovirali tîrzii sînt ARNm transcriși de pe genomul progen de către o transcriptază asociată PSV progen ; ei sînt lipsiți de structura 5′-cap. Semnificația biologică a acestei constatări rezidă în aceea că aparatul celular de proteosinteză suferă — în urma infecției cu reovirusuri — o tranziție de la dependență la independență față de această structură (Skup și Millward, 1981), ARNm virali nemaiconcurînd cu ARNm celulari pentru ribozomi.

Unele studii efectuate *in vitro* au permis punerea în evidență și a transcrierii pretimpurii a anumitor gene, corespunzătoare ARNm pentru polipeptidele $\sigma 3$, σNS, μNS și $\lambda 3$. S-a presupus că legarea proteinelor respective la PSV parental induce unele modificări conformaționale, care vor permite ulterior transcrierea cu viteze similare a tuturor segmentelor de ARN reoviral. Alt model presupune că în celule ar exista un represor care, interacționînd cu PSV, reglează direct transcrierea pretimpurie și indirect pe cea timpurie.

Replicarea ARN. Procesul are loc prin mecanism conservativ. Faptul că *in vivo* genomul reoviral este păstrat sub forma PSV arată clar că replicarea ARN bicatenar diferă de cea a ADN bicatenar. Întrucît ambele catene ale fiecărui segment bicatenar de genom sînt reținute ca atare sugerează că transcripții monocatenari sînt de fapt adevăratele matrițe pentru sinteza ARN bicatenar. Validitatea unui atare mecanism a fost verificată prin diverse experimente, pe baza cărora s-au elaborat și modele pentru sinteza ARN bicatenar reoviral, cum ar fi cel al lui Schönberg și colab. (1971) (fig. 6-32).

Transcripții progeni servesc exclusiv ca ARNm în sinteza proteinelor. Mecanismul care permite doar transcripților parentali să intre în replicare rămîne deocamdată destul de obscur. S-a stabilit totuși că în particulele progene enzimele care introduc structura 5′-cap sînt inactive, așa încît ele produc doar ARNm cu structuri 5′-pG—, deci segregarea celor zece transcripți parentali în complexele de replicare include recunoașterea structurilor 5′-cap, al căror rol nu este încă elucidat.

S-a postulat că activitățile de replicază și de transcriptază sînt îndeplinite alternativ de una și aceeași enzimă. Virionii defectivi de gena L1, care codifică transcriptaza λ 3, nu pot sintetiza ARN dublu-catenar, deși pot transcrie ca ARNm cele zece segmente ale ARN (gene).

Formarea particulelor subvirale cu activitate replicazică. Numeroase dovezi — biochimice și genetice — au arătat reținerea transcripților parentali monocatenari sub formă de provirioni, fiecare provirion avînd cîte o copie din fiecare segment al genomului dublu-catenar de ARN. Probabilitatea formării spontane a unei astfel de particule este doar de

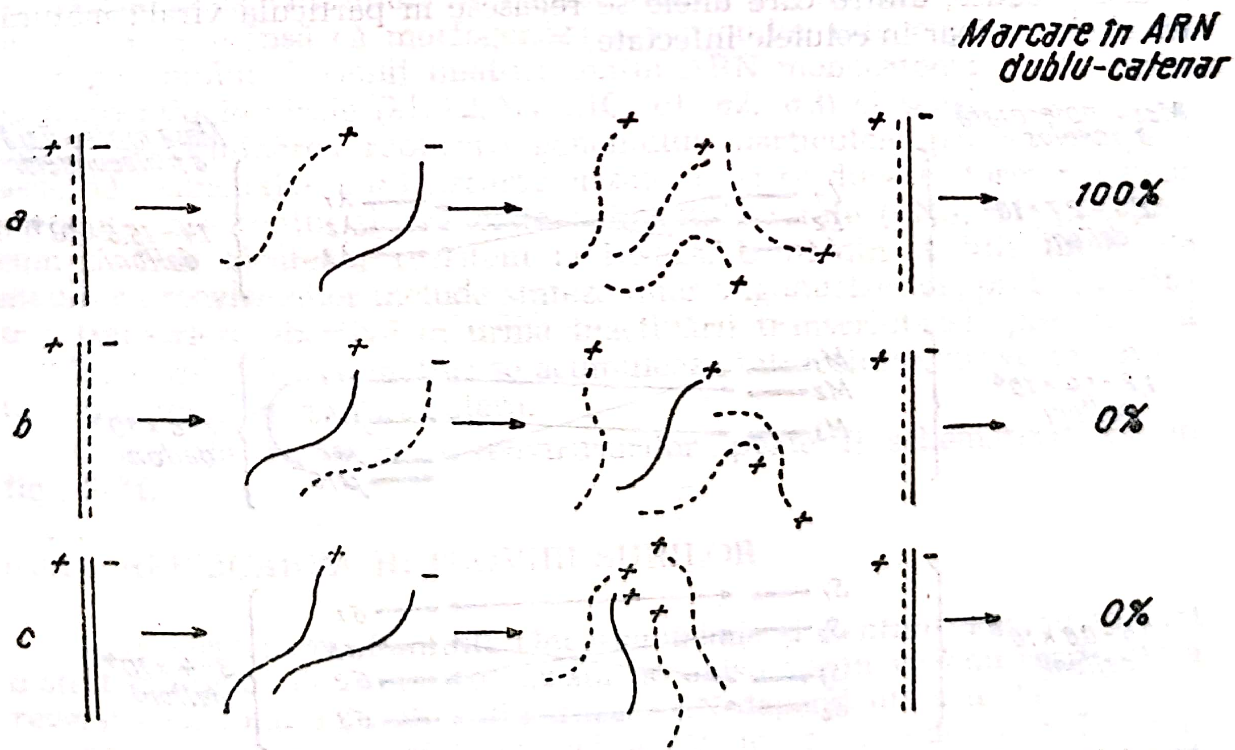


Fig. 6-32 — Modele pentru sinteza ARN dublu-catenar reoviral (după Schönberg și colab., 1971).

10^{-10}, deci este absolut necesar să existe un mecanism cu o înaltă specificitate care să asambleze cele zece specii discrete de ARN în fiecare particulă virală. S-au imaginat două căi posibile de realizare :

— pe baza unor interacţiuni ARN-ARN. S-ar putea ca lanţurile „+" să aibă în unele zone nişte secvenţe complementare care să le permită să formeze complexe conţinînd numărul şi tipul exact de copii ale genelor ;

— pe baza unor interacţiuni ARN monocatenar — proteine structurale. Se presupune că se formează complecşi care nu implică legături covalente şi care pot segrega cele zece fragmente apropiate de ARN monocatenar, eventual şi prin intermediul unor constrîngeri conformaţionale impuse de miezul viral. S-a constatat afinitatea pentru ARN monocatenar a unor polipeptide codificate de virus — cum ar fi δ NS —, fapt care a servit şi la purificarea sa.

Traoducerea ARNm reoviral. Folosind metode de electroforeză de mare rezoluţie, s-au putut detecta 16 polipeptide de origine reovirală, dintre care unele sînt proteine structurale, iar altele constituie probabil produse de clivare a produselor primare de traducere sau au apărut în urma a diverse modificări posttranslaţionale.

ARNm reovirali activi în proteosinteză nu au structură 5′-cap, ceea ce îi face incompatibili cu maşinăria celulară de biosinteză proteică. De aceea, în cursul infecţiei, virusul induce modificări ale acestui aparat, printr-un mecanism incomplet elucidat. Ca urmare a acestei alterări, poliribozomii nou-formaţi vor recunoaşte doar mesajele fără 5′-cap, traducîndu-le cu o deosebită eficienţă.

Fiecare genă virală este tradusă la cîte un polipeptid unic, după cum reiese şi din fig. 6-33. În plus faţă de cele zece polipeptide, mai apar şi alte produse, dintre care unele se regăsesc în particula virală matură, iar altele — doar în celulele infectate.

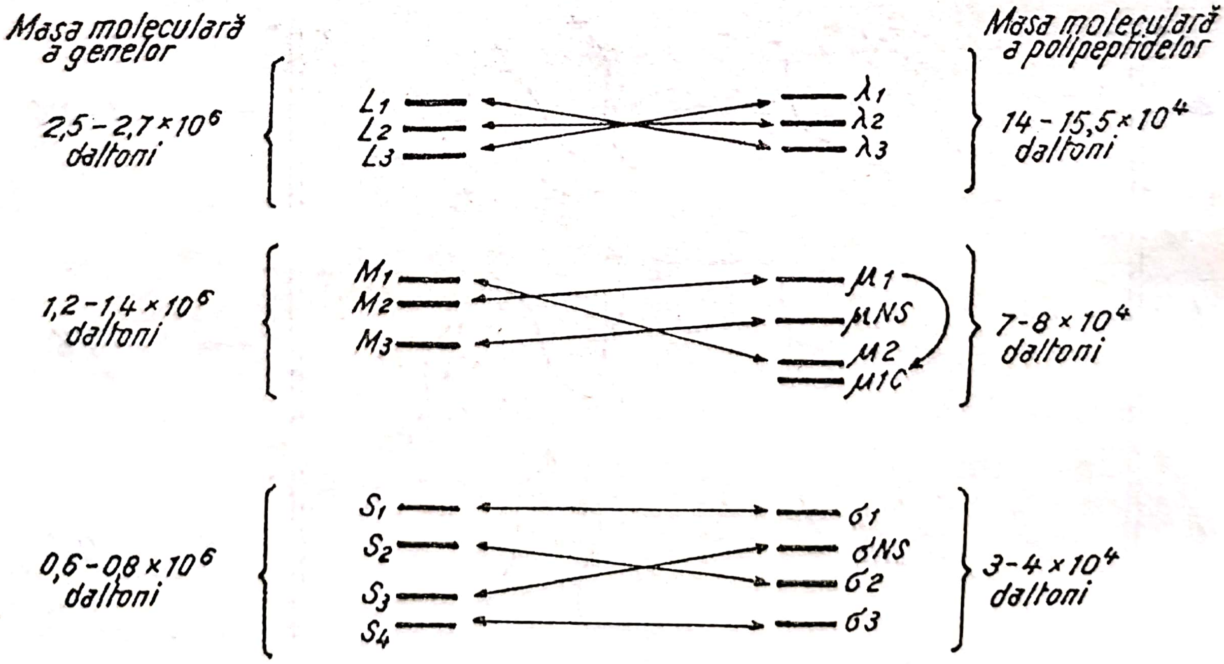


Fig. 6-33 — Corelaţia dintre genele reovirale şi polipeptidele pe care le codifică (după McCrae şi Joklik, 1978).

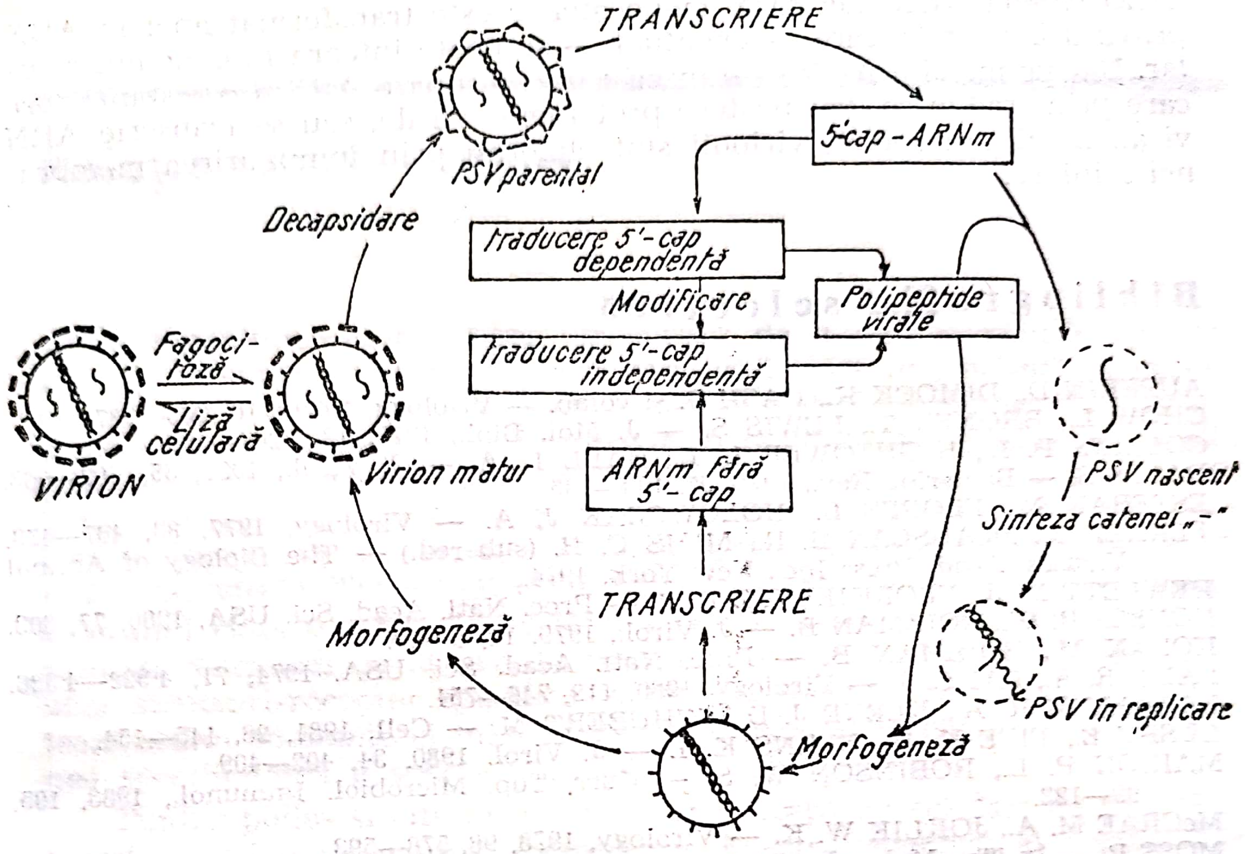

TRANSCRIERE
5'-cap-ARNm
PSV parental
Decapsidare
traducere 5'-cap dependentă
Modificare
Polipeptide virale
traducere 5'-cap independentă
Fagocitoză
Liză celulară
VIRION
Virion matur
ARNm fără 5'-cap
PSV nascent
Sinteza catenei „-"
TRANSCRIERE
Morfogeneză
PSV în replicare
Morfogeneză

Fig. 6-34 — Modelul ciclului de replicare a reovirusurilor (după Skup și colab., 1981).

Asamblarea virionilor. Se cunosc relativ puține date asupra acestui proces. Se știe însă că morfogeneza reovirionilor este cuplată cu replicarea genomului. Virionii imaturi conțin ARN monocatenar „+", cuplat cu polipeptidele virale (λ1, λ2, λ3, μ1C, σ1, σ2, σ3) și sensibil la RNază. Odată cu terminarea replicării genomului, particulele par să sufere o serie de reamenajări încă necaracterizate, ceea ce duce la formarea unor particule care conțin și celelelate polipeptide virale (μNS, μ1, μ2), precum și ARN bicatenar rezistent la RNază. Unul din stadiile finale ale maturării reovirionilor include sinteza unor oligonucleotide, probabil printr-o transcriere abortivă în urma inactivării transcriptazei spre sfîrșitul morfogenezei. Virionii maturi se acumulează intracelular, provocînd eventual moartea și apoi liza celulară.

Ciclul de replicare a reovirusurilor poate fi schematizat ca în fig. 6-34.

6.3.11. REPLICAREA RETROVIRUSURILOR

Retroviridele, cu familiile *Oncornavirinae* și *Lentivirinae*, au adoptat o strategie unică de replicare, bazată pe existența în virionii respectivi a reverstranscriptazei (ADN polimeraza ARN-dependentă sau RT). Virusurile se atașează pe suprafața celulei și pătrund prin endocitoză. În celulele infectate, ARN este transcris la ADN monocatenar complementar, cu care formează un hibrid ADN-ARN. RT cu rol de RNază H, hidrolizează catena ARN, iar ADN monocatenar este transformat apoi în ADN proviral bicatenar, care — eventual — se poate integra în genomul celular. Dar pe matrița ADN se transcriu în continuare ARNm corespunzători, care prin traducere dau naștere proteinelor virale, sau se transcrie ARN viral. După asamblare, virionii sînt eliberați prin înmugurirea membranei celulare.

Bibliografie selectivă

AUPERIN D., DIMOCK K., CASH P. și colab. — Virology, 1982, 116, 363—367.
CHOW L., BROKER T., LEWIS S. — J. Mol. Biol., 1979, 134, 265—303.
COLLINS P. L., HIGHTOWER L. E., BALL L. A. — J. Virol., 1980, 35, 682—663.
DALES S. — Bacteriol. Rev., 1973, 37, 103—135.
ESTEBAN M., FLORES L., HOLOWCZAK J. A. — Virology, 1977, 83, 467—473.
FENNER F., McAUSLAN B. R., MIMS C. H. (sub red.) — The Biology of Animal Viruses, Acad. Press Inc., New York, 1974.
HEWLETT M. J., FLORKIEWICZ R. Z. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, 77, 303.
HONESS R. W., ROIZMAN B. — J. Virol., 1979, 14, 8—19.
KOZAK M., ROIZMAN B. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 4 322—4 326.
LAMB R. A., LAI C. J. — Virology, 1980, 112, 746—751.
LAZZARINI R. A., KEENE J. D., SCHUBERT M. — Cell, 1981, 26, 145—154.
LUSBY E., FIFE K. H., BERNS K. I. — J. Virol. 1980, 34, 402—409.
MARION P. L., ROBINSON W. S. — Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1983, 105, 99—122.
McCRAE M. A., JOKLIK W. K. — Virology, 1978, 98, 578—593.
MOSS B. — În The Molecular Biology of Animal Viruses, Nayak D. P. (red.), vol. II, p. 849—890, Dekker, New York, 1979.
MOYER R. W., GRAVES R. L. — Cell, 1981, 27, 391—401.
NOMOTO A., TOYODA H., IMURA N. — Virology, 1981, 113, 54.
OU J. H., RICE C. M., DALGARNO L. și colab. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, 79, 5 235.
OU J. H., STRAUSS E. G., STRAUSS J. H. — J. Mol. Biol., 1983, 159, 415—427.
RACANIELLO V. R., BALTIMORE D. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78, 5 887.
REKOSH D. M. K., RUSSELL W. C., BELLETT A. J. D. — Cell. 1977, 11, 263—295.
RICE C. M., STRAUSS J. H. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78, 2 062.
RICHARDSON W. D., WESTPHAL H. — Cell, 1981, 27, 133—141.
ROIZMAN B. — Cell, 1979, 16, 481—494.
ROIZMAN B., BATTERSON W., KNIPE D. M. — În Perspectives in Virology, Pollard M. (red.), vol. XI, p. 77—92, Alan R. Liss Inc., New York, 1981.
ROWLANDS D. J. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 4 793—4 797.
SALDITT-GEORGIEFF M., HARNOLD M., CHEW-KIANG S. — Cell, 1980, 19, 69—78.
SCHEID A., CHOPPIN P. W. — Virology, 1976, 69, 265—277.
SCHÖNBERG M., SILVERSTEIN S. C., LEVIN D. H. și colab. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1971, 68, 505—508.
SIDDELL S., WEGE H., ter MEULEN V. — Curr. Top. Microbiol, Immunol., 1982, 100, 131—164.
SKUP D., MILLWARD S. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 77, 152—156.
STRAUSS E. G., STRAUSS J. H. — Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1983, 105, 2.
SUMMERS J., MASON W. S. — Cell. 1982, 29, 403—415.
TATTERSALL P., WARD P. — Nature, 1976, 263, 106—109.
ULMANEN L., SEPPÄLÄ P., PETTERSON R. F. — J. Virol., 1981, 37, 72—79.
WATSON J. D. — În Molecular Biology of the Gene, p. 670, W. A. Benjamin Inc., Menlo Park, California, 1977.
WINTER G., FIELDS S. — Nucleic Acid Res., 1981, 8, 1 965—1 974.

7

Relaţii virus — gazdă

Patogenitatea, capacitatea virusurilor de a induce manifestări clinice în organismele infectate, este rezultatul unor interacţiuni complexe la care participă factori implicaţi în caracteristicile biologice, biochimice şi genetice ale virusului, pe de o parte, şi reactivitatea gazdei, pe de altă parte. De aceea, nu este uşor de definit baza moleculară a patogenităţii. Totuşi, se poate porni de la premisa că boala se manifestă clinic dacă funcţii importante sau vitale ale unor grupe de celule sînt alterate de replicarea virală. Tropismul unui virus pentru o celulă-gazdă reprezintă, în primul rînd, o interacţiune între componentele de suprafaţă ale virusului şi receptorii de la nivelul membranei celulelor infectate. Prezenţa unor structuri-receptor specifice la nivelul membranei celulare influenţează sediul anatomic al infecţei virale, consecinţele clinice şi, de asemenea, specificitatea de specie a unui anumit agent viral.

Pentru polio- şi alte picornavirusuri, receptorii celulari au fost identificaţi ca fiind de natură lipoproteică. Fiecare membru al acestui larg grup de virusuri pare să aibă un receptor lipoproteic de specificitate unică. Receptorul pentru poliovirusuri este codificat de cromozomul 19. Informaţia genetică pentru aceşti receptori poate să nu fie egal exprimată în celulelele diferenţiate, ceea ce explică tropismul tisular variabil al multor tulpini de poliovirusuri. Studii recente cu anticorpi antiidiotip au adus contribuţii majore la identificarea receptorilor virali, permiţînd explicaţii moleculare ale vechilor noţiuni de histo- sau citotropism şi sugerînd căi noi de profilaxie a infecţiilor virale. Într-adevăr, utilizarea anticorpilor antiidiotip ca vaccinuri virale permite interferarea infecţiei în stadiul cel mai timpuriu al iniţierii sale, şi anume blochează interacţiunea virus-receptor celular. Vaccinurile preparate după metode convenţionale induc anticorpi neutralizanţi care se cuplează cu proteine structurale virale, acţionînd deci numai după desfăşurarea cîtorva cicluri productive ale infecţiei.

7.1. SPECTRUL DE GAZDĂ ŞI TROPISMUL CELULAR

7.1.1. RECEPTORII VIRALI

Prezenţa sau absenţa receptorilor celulari specifici influenţează nemijlocit spectrul de gazdă, tropismul tisular şi celular al virusului. Elemente restrictive pot interveni însă şi în etapele ulterioare ale replicării : penetrare, decapsidare, antrenare a metabolismului celulei-gazdă în producţia structurilor virale. Anticorpii antiidiotip, edificaţi în raport cu unele segmente ale regiunii variabile a imunoglobulinelor, reproduc imaginea internă a antigenului. Pare surprizător ca un anticorp să mimeze structura unui antigen, dar, ținînd seama de diversitatea imunoglobulinelor, este logic să se presupună că structuri atît de diferite și flexibile în dispoziția lor tridimensională pot mima alte molecule. Date experimentale recente (Bruck și colab., 1986) au confirmat faptul că secvența de aminoacizi ai hemaglutininei reovirale (antigenul) are o regiune omoloagă cu cea a lanțului ușor al imaginii interne a antihemaglutininei (anticorpul). În tabelul 7-I sînt sintetizate informațiile actuale asupra naturii și identității receptorilor pentru alte virusuri. Receptorii celulari sînt, frecvent, de natură glicoproteică iar acidul sialic pare a fi o componentă critică în interacțiunea virus — receptor. Virusul Sendai se leagă de o structură carbohidrat specifică (Neu Aca 2), dar nu de alte gangliozide conținînd unul sau mai multe reziduuri de acid neurinamic (Neu Aca). Alte myxovirusuri sînt mai puțin restrictive. Pentru virusul gripal, toți compușii conținînd acid neurinamic pot acționa ca receptori, indiferent de modalitatea de legare a carbohidratului.

TABELUL 7-1

Identitatea unor receptori virali

Virusul	Receptorul	Indicația bibliografică
Gripal A și B	Glicoforina pe hematii	Enegren și Burnes (1977)
Rabic	Receptori pentru acetilcolină la joncțiunea neuromusculară	Lentz și colab. (1982)
Epstein-Barr	Receptori pe limfocit B	Wells și colab. (1983)
HIV	Receptori pe limfocit T	Popovic și colab., (1983)

Caracterizarea receptorilor pentru multe alte virusuri este mai puțin clară, însă pare normal ca identitatea lor să se suprapună cu a unor receptori hormonali, farmacologici etc. Pentru virusuri aparținînd unor familii diferite, probe indirecte au evidențiat existența unor receptori comuni : virusul Coxsackie B3 și adeno 2 sau Coxsackie A21 și rhinovirusul 14. Este interesant că identitatea de receptori corespunde cu identitatea tropismului celular : prima pereche cuprinde agenți enteropatici, cealaltă — respiratori.

Selecția unor variante virale cu tropism modificat se poate realiza *in vitro*, în culturi de celule, sau *in vivo*, prin pasaje repetate care favorizează populația de virioni cu afinitate mai mare a receptorilor pentru noul substrat. Pe de altă parte, aceeași dinamică a expresiei receptorilor o întîlnim și la nivelul membranei celulare, unde numeroși factori intervin în modularea receptorilor, în primul rînd, creșterea și diferențierea celulară. De exemplu, au fost comparate celule provenite din culturi vechi, în fază staționară, cu celulele în fază exponențială de creștere. Ultimele celule leagă de 10 ori mai mult virus decît primele ; la fel, în cazul celulelor limfoide sau mieloide (Morishima și colab., 1983). În general, celulele diferențiate ale seriilor sanguine sînt mai puțin susceptibile decît precursorii. Limfocitele sau macrofagele periferice umane nu sînt susceptibile pentru virusul rujeolic, dar stimularea cu mitogeni (fitohemaglutinină) le conferă capacitatea de a fi infectate.

Prezența și cantitatea receptorilor superficiali joacă un rol esențial în susceptibilitatea virală, însă și fazele ulterioare ale replicării pot interveni în severitatea și spectrul tisular al infecției. În cazul enterovirusurilor s-a demonstrat că funcții virale timpurii sînt responsabile de blocarea sintezei proteinelor celulare, ceea ce are ca urmare apariția efectului citopatic. În cazul adenovirusurilor, numai funcții tardive — legate de sinteza „fibrelor“ din proiecțiile capsidei virale — sînt urmate de efect citotoxic. Fibrele au efect citotoxic atît în cursul sintezei noilor progeni, cît și în cazul prezenței lor în cantitate mare în inocul — efect citotoxic „din afară“. Modificări subtile ale metabolismului celular însoțesc și replicarea virusurilor aparent noncitopatice. De exemplu, virusul rubeolic. infectînd productiv celulele diploide umane, lasă mult timp substratul celular aparent neafectat. Arbovirusurile se replică în celule de insecte fără a determina leziuni aparente, în timp, ce în celule mamifere, efectul este invariabil litic.

Țesuturile infectate au rol determinant în expresia patogenității virale. Distrugerea unor celule de neînlocuit, foarte importante funcțional (neuronii, celulele Langerhans din pancreas etc.), este mult mai gravă decît citoliza unor celule înlocuite rapid, cum sînt enterocitele în cazul infecțiilor inaparente cu poliovirusuri.

Trei metode moderne au permis studiul receptorilor celulari cu acuratețe sporită :

— sinteza anticorpilor monoclonali antireceptor ;
— sinteza anticorpilor antiidiotip care mimează antigene virale ;
— utilizarea unor analogi peptidici sintetici care blochează situsurile de ancorare virală.

În urma unor astfel de studii, Dimmock (1982) a introdus conceptul de *receptor productiv,* adică receptor care conduce sigur la infecție, deosebit de alții implicați în legarea nespecifică a virionilor. Multe virusuri cu anvelopă se pot lega de substraturi nespecifice, chiar sintetice (polistiren). Atașarea nespecifică a virionilor la unele substraturi (colagenul, de exemplu) poate avea importanță patogenică, pentru că se realizează concentrații mari de virioni în zone unde există și receptori productivi. In general, organele-țintă ale infecției virale au astfel de receptori productivi, care sînt similari cu receptorii cu afinitate înaltă. Kristensson (1978) a sugerat că existența receptorilor cu afinitate înaltă la nivelul butonașelor terminale ale axonilor explică neurotropismul unor virusuri. Arbovirusurile, cunoscute ca neurotrope selective, au o situație particulară, întrucît ciclul lor biologic include și insecte și vertebrate. S-a postulat existența a două antigene superficiale care se pot lega de doi receptori diferiți : la insecte și la vertebrate. Este o ipoteză plauzibilă, ținînd seama de existența a două glicoproteine distincte în anvelopa arbovirusurilor.

În cursul evoluției tropismului viral, una din posibilitățile de eludare a mecanismelor efectoare ale răspunsului imun al gazdei a fost dezvoltarea unor structuri virale cu afinitate mare pentru receptori situați pe celulele imunocompetente. Virusul Epstein-Barr, de exemplu, cuplează limfocitele B unde rămîne latent. Totodată, virusul Epstein-Barr este implicat și în etiologia carcinoamelor nazofaringiene, tumori inițiate de la celule lipsite de receptori pentru virus. Recent, s-a sugerat că o infecție inițială cu un alt virus (paramyxo) permite atașarea virusului Epstein-Barr de celulele epiteliale, ca un prim pas în inducția carcinogenezei (Khelifa și Menezes, 1983).

Experimental a fost demonstrată posibilitatea scurtcircuitării primei etape, de adsorbție, a ciclului de replicare virală în cazul poliovirusurilor. Acidul nucleic izolat de componentele capsidare poate infecta celule care în mod normal nu sînt susceptibile. Acest mod de penetrare a genomului nu pare a fi operant în mod natural.

O situație opusă, cu perspective practice, a derivat din recunoașterea specificității chimice a receptorilor ca determinanți ai tropismului tisular. Lipozomii și alte construcții sintetice asemănătoare, simulînd membranele celulare, sînt utile în modularea atașării unor virusuri la substrat sau în blocarea (prin competiție) a adsorbției.

7.1.2. GENELE VIRALE IMPLICATE ÎN TROPISMUL TISULAR

Analiza evenimentelor timpurii ale replicării virale a permis identificarea genelor responsabile pentru tropism. Numai un astfel de control poate explica localizarea specifică a virusurilor în anumite țesuturi și, în cazul țesuturilor, în anumite celule. De exemplu, deși cele trei tipuri de reovirusuri umane sînt similare ca structură a capsidei și ca organizare genomică, ele infectează șoarecele sugar în manieră diferită (tabelul 7-II). Genomul segmentat al reovirusurilor permite analiza acestui fenomen prin construcția unor hibrizi. Gena S1, responsabilă de sinteza hemaglutininei virale, este singura implicată în tropism. Mai mult, în molecula proteică a hemaglutininei există unele regiuni specifice implicate în tropism, altele în inducția anticorpilor seroneutralizanți, altele în legarea de hematii. Cu anticorpi monoclonali specifici pentru diferiții epitopi ai hemaglutininei s-au precizat domenile moleculare care participă în atașarea dferitelor tipuri reovirale de țesuturi distincte.

TABELUL 7-II

Tropismul reovirusurilor (după Fields, 1984)

Tipul virusului	Tropsim tisular	Tropism celular
REO 1	nervos hipofizar	ependim lob anterior
REO 3	nervos hipofizar	neuroni lob intermediar și posterior

La poliovirusuri, se consideră că toate cele patru polipeptide ale capsidei participă în procesul de adsorbție. În realitate, studiile de cartografiere ale ARN genomic au demonstrat importanța unor alterări punctiforme în modificarea tropismului. De exemplu, două tulpini de tip 3: Leon (precursorul tulpinii vaccinante Sabin) şi tulpina revertant 119 (izolată de la un caz fatal de poliomielită asociată vaccinării) sînt neurovirulente la maimuţă. Ambele diferă de tulpina vaccinantă, lipsită de neurotropism, prin modificări într-o regiune limitată la 3/4 dintr-o secvenţă de 55—60 de oligonuclotide, ceea ce este infim în comparaţie cu genomul integru, estimat la 7 500 de baze.

Pentru virusul rabic, analiza cu anticorpi monoclonali a definit regiunea din glicoproteina de înveliş (G) ca fiind implicată în virulenţă. S-a constatat că substituţia într-o singură poziţie — 333 — a secvenţei de aminoacizi, a argininei cu izoleucină sau glutamină, este suficientă pentru atenuarea tulpinii respective. Substituţia inversă se însoţeşte de reversia la virulenţă.

În concluzie, specificitatea tropismului viral este îngust codificată de genomul viral. Modificări mutaţionale minime sînt însoţite de modificări majore în tropism. Aceasta explică de ce regiunile genomice, codificînd tropismul, sînt dintre cele mai conservate şi mai stabile din genomul viral.

7.2. REZISTENŢA GENETICĂ A GAZDEI LA INVAZIA VIRALĂ

7.2.1. GENE ALE GAZDEI CARE INFLUENŢEAZĂ SUSCEPTIBILITATEA VIRALĂ

Infecţiile virale care afectează sau omoară o anumită specie-gazdă exercită o presiune selectivă. Alelele gazdei care asigură rezistenţa la infecţie prezintă un avantaj selectiv şi vor fi perpetuate. În acest mod, selecţia naturală produce un echilibru ecologic care asigură perpetuarea lanţului epidemic. Studii clasice în acest domeniu a efectuat Sabin (citat de Bang, 1978), stabilind că rezistenţa şoarecilor la flavivirusuri este unifactorială, mendeliană şi se transmite de o manieră dominantă. Mecanismul rezistenţei este intrinsec celular. Culturile de celule obţinute de la liniile congeneice de şoareci rezistenţi produc titruri mai mici (în jur de 10 000 de ori) decît culturile comparabile obţinute din liniile susceptibile (Darnell şi Koprowski, 1974). S-a sugerat (Brinton şi Fernandez, 1983) că proteinele specificate de alelele care imprimă rezistenţa la flavivirusuri interacţionează specific cu complexul replicativ ARN, afectînd interacţiunea matriţă — polimerază.

Chiar dacă animalele rezistente produc mai puţin virus, ele pot fi infectate fie cu doze mari inoculate intracerebral, fie după imunosupresie. Este evident că şi la animalele rezistente funcţionarea sistemului imun este necesară pentru exprimarea fenotipică a rezistenţei.

Modelul infecţiilor virale experimentale la şoarece a permis cîteva generalizări importante (vezi tabelul 7-III):

1. genele care controlează rezistenţa (R) sînt specifice pentru fiecare familie de virusuri, uneori (cazul coronavirusurilor) pentru fiecare specie;

2. unul două, rareori mai multe locusuri care segregă separat sînt implicate în rezistență sau susceptibilitate (S) ;

3. cea mai mare parte a acestor locusuri sînt cartografiate la distanță de locusurile sistemului H-2 și nu acționează prin intermediul sistemului imun al gazdei ;

4. expresia fenotipică a rezistenței la animal poate fi modificată de *variabile ale gazdei :* vîrstă, imunosupresie sau de *variabile ale virusului :* rezistență la inhibitori nespecifici, virulență, doză etc.

TABELUL 7-III

Locusuri genetice la șoarece care influențează susceptibilitatea virală
(după Brinton și Nathanson, 1981)

Virusuri ADN	Boala	Nr. gene	Trăsătura dominantă	Raport cu sistemul H-2
HSV	encefalită	2	R	—
CMV	encefalită	1	S	+
Polyoma	tumori	1	S	?
Pox (ectromelia)	variola șoarecelui	1	?	?
Virusuri ARN				
Flavivirusuri	encefalită	1	R	—
Influenza A	pneumonie	1	R	—
Rujeolic	encefalită	1	R	—
Rabic	encefalită	1	R	—
Corona	hepatită	1	S	—

7.2.2. REZISTENȚA MEDIATĂ DE GENELE RĂSPUNSULUI IMUN

Complexul de gene care reglează răspunsul imun intervine fie în rata de proliferare a celulelor imunocompetente, fie în modularea unor funcții nespecifice ale acestor celule. Evident că această reglare este poligenică. Eforturile de selectare a unor tulpini de șoarece care să răspundă cu titruri mari („*High-responders*“, Hr) sau mici („*Low-responders*“, Lr) de anticorpi la o anumită infecție virală au indicat diferențe de cel puțin 10 gene. În măsura în care cunoștințele actuale sînt complete, există două sisteme genetice care reglează nu numai amplitudinea răspunsului imun, ci și specificitatea sa :

— genele structurale pentru lanțurile grele ale imunoglobulinelor, care intervin în specificitatea situsului de combinare al anticorpilor și

— genele complexului major de histocompatibilitate (MHC) care reglează amplitudinea și specificitatea răspunsului imun.

Evolutiv, se poate aprecia că au fost selectate genotipurile care asigură un răspuns imun optim la patogenii virali sau bacterieni din mediu. În cazul în care anticorpii la antigenele exogene prezintă reacții încrucișate cu antigenele *self*-ului se pot dezvolta boli autoimune. Participarea unor virusuri în etiologia acestor boli este numai o coincidență. Este de presupus că viitorul va implica și alte locusuri genetice în determinismul susceptibilității prin intermediul răspunsului imun : genele minore de histocompatibilitate, genele care influențează macrofagele în prezentarea antigenelor etc.

7.2.3. REZISTENȚA MEDIATĂ SIMULTAN DE GENE VIRALE ȘI ALE GAZDEI

Tipul C de retrovirusuri murine se divide, din punctul de vedere al spectrului de gazdă, în trei clase : *ecotrope*, *xenotrope* și *dualotrope*. Studiind linia AKR de șoarece, care dezvoltă spontan leucemie începînd cu vîrsta de 4—6 luni, Gross (1951) a constatat prezența unui retrovirus endogen. Mult timp nu s-a putut preciza ce anume favorizează proprietățile oncogene ale unui retrovirus aparent inocuu. Kawashima și colab. (1976) au arătat că un virus ecotrop parazitează șoarecii AKR încă de la naștere, în timp ce un al doilea retrovirus — xenotrop — marchează o creștere notabilă de titru odată cu dezvoltarea tumorilor spontane. Agenții oncogeni rezultă din recombinarea celor două tipuri de virus. Modificările genomice ale recombinanților în raport cu parentalii sînt situate la capătul 3′, în regiunea implicată în codificarea proteinei anvelopei virale — gp70 —, responsabilă de legarea virusului de receptorii celulari. Mecanismul leukemogenezei a fost explicat prin două alternative : una virală (*a*), una celulară (*b*).

a) Lung și colab. (1983) au separat recombinanții în două clase :

— oncogeni, de origine timică, timotropi ;

— nononcogeni, de origine splenică, nontimotropi.

Tropismul acestor virusuri este mai important pentru leukemogeneză decît însăși infectivitatea lor. Într-adevăr, multe linii limfoide nu produc virus, însă capacitatea antigenelor virale implicate în tropism de a fi exprimate este constantă. Încă o caracteristică specifică acestor virusuri trebuie reținută, și anume transmiterea verticală. De altfel și tumorile apărute la șoarecii AKR sînt de origine clonală și nu s-a observat diseminarea lor orizontală, cum ar fi logic în cazul implicării unui agent infecțios care contribuie la menținerea transformării celulare.

b) Premisa esențială a alternativei celulare este transmiterea mendeliană a genelor virale, sub controlul genelor celulare. Se pare că exprimarea unui anumit tip de proteină — gp70 — asociat carcinogenezei nu poate avea loc decît în anumite celule-gazdă. S-a sugerat că aceste celule au caracteristic expresia unui antigen de diferențiere care produce stoparea diferențierii și expansiunea tumorală (Elder, 1984). Dacă expresia constitutivă a unei molecule codificate de un recombinant viral sau inducția unui oncogen celular este cauza nemijlocită a transformării celulare rămîne să se demonstreze. Valoarea aplicativă a acestui model constă în premisele ce le oferă pentru aprecierea modificărilor genomice, necesare și suficiente pentru crearea unui virus oncogen.

7.3. CULTIVAREA VIRUSURILOR

7.3.1. SISTEME VIRUS — GAZDĂ

În anii de pionierat, unica modalitate de recunoaştere a etiologiei virale a unei afecţiuni era reproducerea bolii experimentale la animalul de laborator cu produse recoltate de la bolnavi. De asemenea, un alt postulat Koch proba etiologia infecţioasă : transmiterea în serie a bolii experimentale. De regulă, scurtarea perioadei de incubaţie şi procentajul superior al animalelor bolnave traduceau adaptarea agentului viral la noua gazdă. Limitele impuse de acest sistem de cultivare a virusurilor au fost evidenţiate de studiile cantitative, care reclamau un număr mare de animale şi erau greu reproductibile. Alte alternative, mai accesibile şi mai fiabile, s-au impus : oul de găină embrionat (Goodpasture, 1939) şi culturile de celule (Enders, Weller, Robins, 1949).

Ouăle embrionate, în vîrstă de 5—14 zile, pot fi inoculate pe diverse căi (tabelul 7-IV). După inoculare, ouăle sînt reincubate pentru cîteva zile, la temperaturi suboptimale (35—37°C), şi examinate zilnic în vederea notării semnelor care probează replicarea virală. Cultivarea virusurilor în acest sistem este deosebit de productivă ; metoda serveşte atît în studiile de izolare şi identificare, cît şi pentru producţia antigenelor de diagnostic sau a vaccinurilor.

TABELUL 7-IV

Căi de inoculare pe oul de găină embrionat

Calea de inoculare	Exemple de virusuri	Semnele cultivării virusurilor
Intraembrionar, intravitelin	rickettsii, virus herpetic	moartea embrionului
Membrana corioalantoidiană	poxvirusuri, virus herpetic	apariţia de „plaje“ sau „pocks“-uri
Intraalantoidian, intraamniotic	virusuri gripale, virusuri paragripale	hemaglutinare

Culturile de celule cele mai utilizate în laboratoarele de virusologie medicală sînt de origine umană sau simiană. Multiplicarea virală este relevată de : apariţia efectului citopatic, inhibiţia metabolismului celular, apariţia hemadsorbţiei sau a altor antigene virus-specificate la suprafaţa celulelor infectate (detectate prin imunofluorescenţă, de exemplu). În cazul unor virusuri noncitopatogene (virusul rubeolic), replicarea poate fi relevată de interferenţa multiplicării unui al doilea virus citopatogen (virusul ECHO).

Fiecare din aceste sisteme clasice de cultivare a fost ameliorat de-a lungul anilor. În cazul animalelor de laborator, trei direcţii importante trebuie subliniate : iniţierea liniilor inbredizate, obţinerea animalelor

„germ-free“ și standardizarea metodelor de îngrijire și hrănire. Pentru ouăle embrionate menționăm livrarea ouălor *„leukosis-free“* și punerea la punct a metodei de cultivare pe fragmente de membrană corioalantoidiană. În fine, culturile de celule, sistemul cel mai utilizat, au fost centrul unor ameliorări tehnologice remarcabile. Au apărut culturile rotate, în suspensie sau pe *„microcarriers“*, procedee în care creșterea densității celulare conduce la obținerea unor titruri superioare de virus. Virusuri care nu cultivă în culturi obișnuite au putut fi multiplicate în culturi de organ (rhinovirusuri) sau prin fuziunea celulelor infectate latent cu celule susceptibile (virus herpetic, virus rujeolic). Modificarea genomului viral poate, de asemenea, influența capacitatea de replicare în culturi (rotavirusuri). Artificii experimentale, motivate de o cunoaștere mai profundă a biologiei celulare, au făcut posibilă izolarea de noi agenți în culturi de celule. De exemplu, HTLV au fost „demascate“ numai în linii limfoblastoide inițiate prin cultivarea limfocitelor T în prezența interleukinei și a anticorpilor antiinterferon în mediul de cultură. Accesibilitatea și reproductibilitatea rezultatelor obținute în culturi de celule au fost condiționate de progresele în standardizarea sistemului, legate, pe de o parte, de obținerea liniilor diploide și, pe de altă parte, de formularea unor rețete de medii unanim acceptate.

Ultima decadă a adus în discuție producția antigenelor virale prin *bioinginerie*. Această alternativă este extrem de utilă în cazul unor agenți cu potențial patogen deosebit sau a virusurilor care nu cultivă în sismele tradiționale. Trei categorii de organisme au fost utilizate pentru expresia proteinelor virale prin bioinginerie : procariote, eucariote unicelulare și celule de mamifer în cultură (tabelul 7-V). Eucariotele (*Saccharomyces cerevisiae,* celule simiene COS, transformate cu SV40 etc.) prezintă avantaje calitative notabile : capacitatea de secreție și de glicozilare a proteinelor recombinante, prelucrarea posttraducere, realizarea unor structuri tridimensionale similare proteinelor native. Un dezavantaj, deloc neglijabil, este prețul de cost mai ridicat decît în sistemele procariote. Randamentul procariotelor *(Escherichia coli, Bacillus subtilis, Pseudomonas fluorescens)* este net superior, însă metodologia extracției proteinelor recombinante este laborioasă și însoțită uneori de pierderi de activitate specifică.

TABELUL 7-V

Biosinteza antigenelor virale prin inginerie genetică

Sistemul	Exemple
Procariote	Antigene ale virusului febrei aftoase, AgHBs
Eucariote unicelulare	Hemaglutinină gripală, AgHBs
Celule simiene transformate	AgHBs, AgHBc

7.3.2. FORMAREA INCLUZIILOR VIRALE

Structurile specific virale apărute ca urmare a replicării virusurilor în celulele infectate se numesc *incluzii*. Aspectul microscopic al incluziilor depinde de tehnica histologică aplicată. Fixarea la pH neutru cu formol

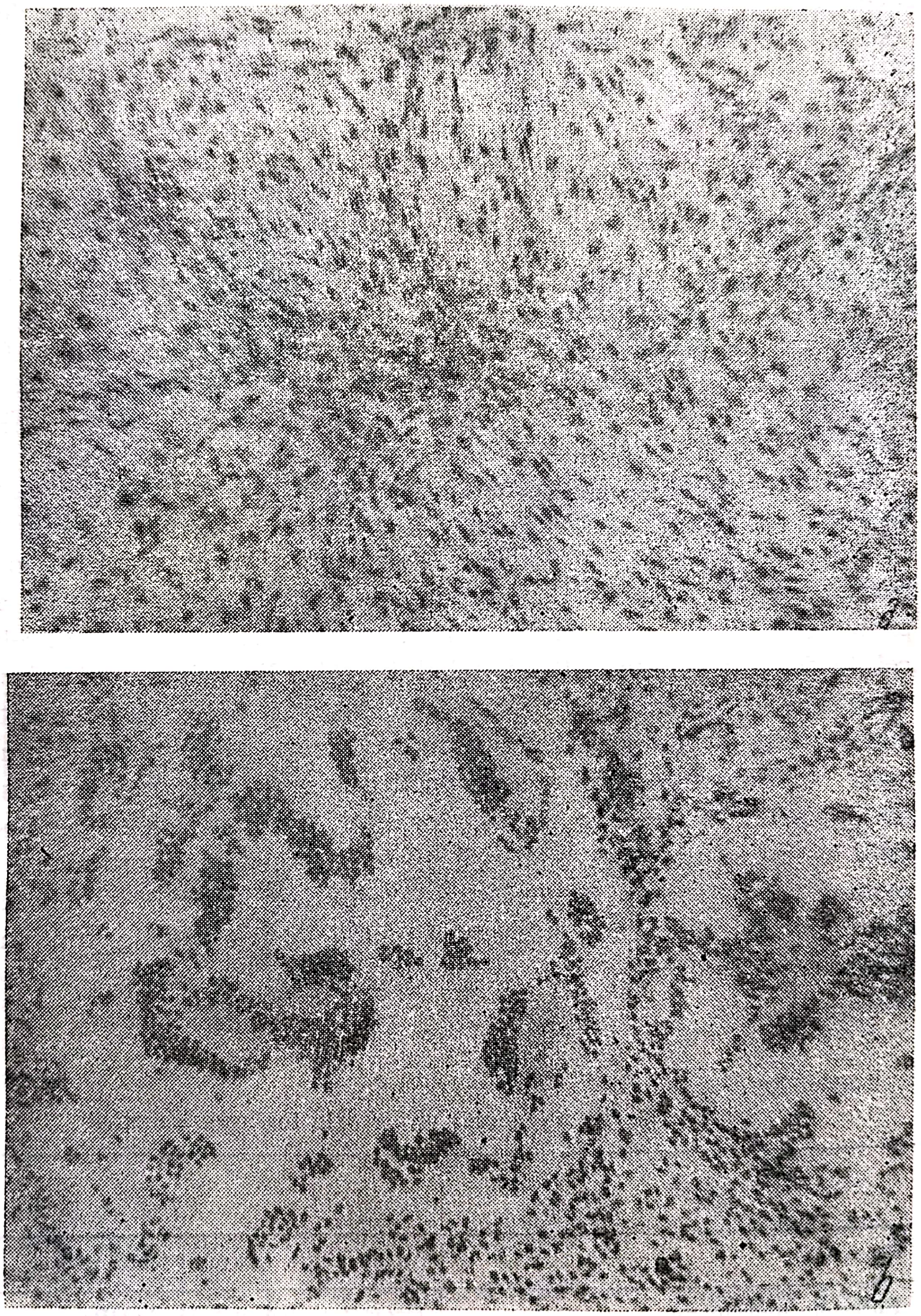
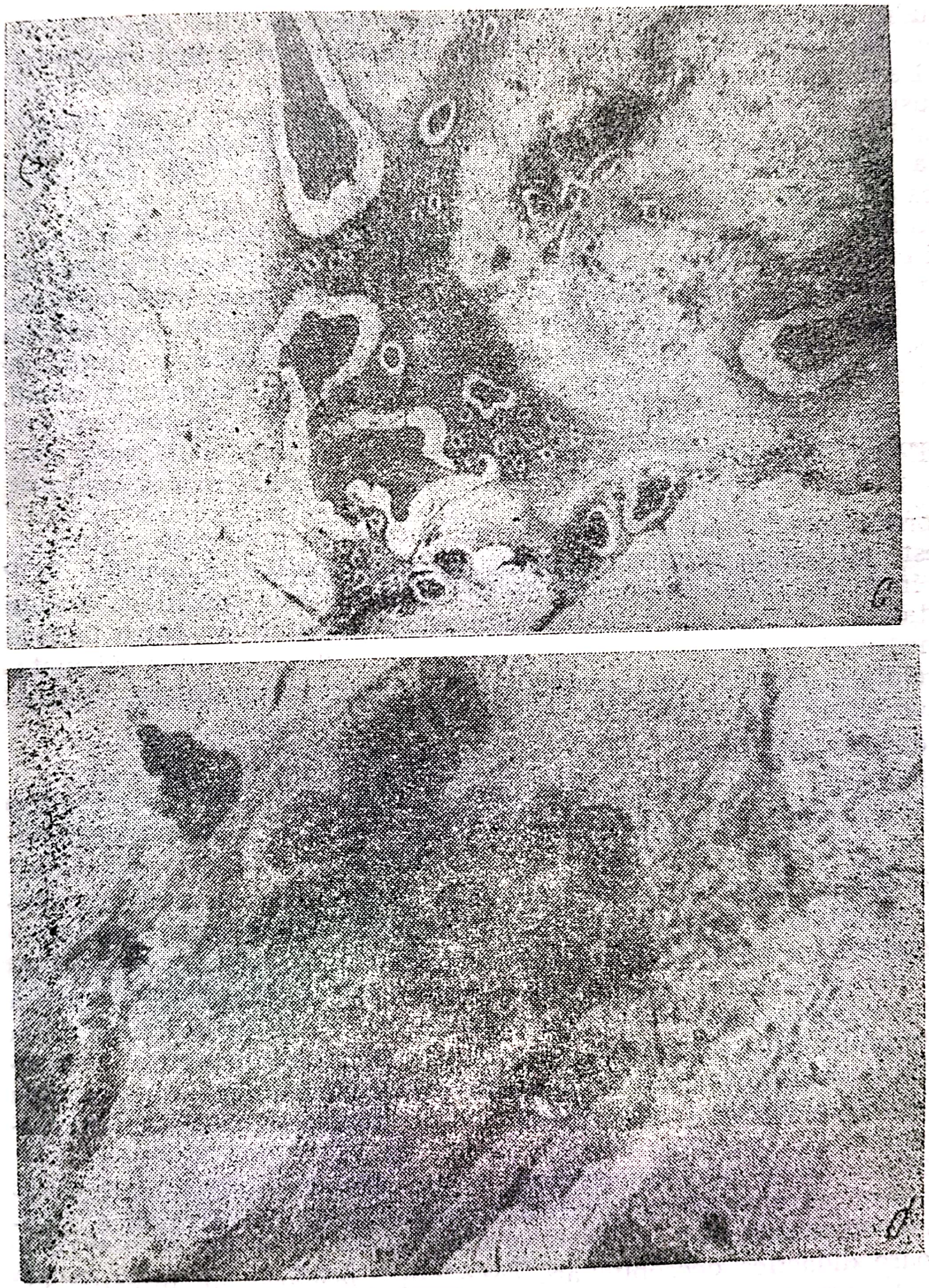


Fig. 7-1 — Diferite aspecte
a — cultură-martor de fibroblaşti de embrion uman ; *b* — aceeaşi cultură
intranucleare şi

sau OsO_4 și colorarea cu coloranți acizi vizualizează incluzii care acoperă întreaga arie nucleară neocupată de cromatină. Folosirea fixatorilor acizi (Zenker, Bouin, Carnoy) facilitează evidențierea haloului periincluzionar (fig. 7-1).



morfologice de efect citopatic (ECP).
infectată cu virus rujeolic — ECP sincițial (×140) ; *c* și *d* — incluzii. intracitoplasmatice (×900).

Incluziile sînt localizate în nucleu, citoplasmă sau în ambele sectoare celulare. Valoarea lor diagnostică este bine cunoscută : corpusculii intracitoplasmatici Babeş-Negri din neuronii cornului Ammon sînt patognomonici în rabie. Diagnosticul diferenţial între variolă (incluziile intracitoplasmatice, Guarnieri) şi varicelă (incluzii intranucleare) prin examene histologice a constituit multă vreme un procedeu rapid de orientare.

Studii citochimice şi prin imunofluorescenţă, executate simultan, au adus precizări importante asupra naturii şi semnificaţiei incluziogenezei virale. De regulă, incluziile reprezintă sediul sintezei componentelor virale (reovirusuri, poxvirusuri) sau al depozitării particulelor virale mature (papovavirusuri, în *molluscum contagiosum*). În virusologia clasică, semnificaţia incluziilor, a acestor neoformaţiuni cu comportare tinctorială modificată, a fost amplu documentată, insistîndu-se asupra formei, dimensiunilor (între 1—30 μm), numărului, localizării intracelulare, histochimiei etc. În general, se poate afirma că incluziile reprezintă corespondenţi morfologici ai procesului de replicare virală (Zarnea, 1983), existînd un paralelism între iniţierea şi dezvoltarea incluziogenezei şi producţia de virus. Din păcate, valoarea lor diagnostică nu are totdeauna gradul de specificitate adus de metodele moderne de diagnostic virusologic rapid.

7.3.3. TIPURI DE EFECT CITOPATIC

Expresia morfologică a leziunilor celulare viral-induse în culturi de celule este etichetată ca efect citopatic (ECP). Rapiditatea apariţiei ECP variază între leziunile hiperacute, de tip citotoxic sau citocid, şi leziuni lent instalate, adeseori cu valoare diagnostică orientativă Între factorii care concurează la producerea ECP menţionăm : blocarea unor căi metabolice celulare, alterări ale permeabilităţii membranei celulare, apariţia incluziilor virale, alte modificări ale organitelor celulare.

Se descriu mai multe tipuri morfologice de ECP :

- *citotoxic* — produs de infecţii masive, hiperacut, fără a exista timp pentru sinteza virusului progen. Aceste leziuni au fost asimilate cu fenomenul lizei „din afară" în cazul bacteriilor parazitate de fagi ;
- *citolitic* — caracterizat prin alterări celulare acute (rotunjire, ratatinare) şi pierderea capacităţii celulelor de a reţine coloranţii vitali ;
- *sinciţial* — indus de virusuri care posedă proteine structurale „de fuziune" (herpesvirusuri, paramyxovirusuri, retrovirusuri). De notat că fuziunea celulară indusă viral este independentă de replicare şi poate avea loc în prezenţa virusurilor inactivate sau a unor fracţiuni virale. Obţinerea heterocarionilor prin fuziune cu virus Sendai a fost folosită în perioada iniţială pentru inducţia hibridoamelor producătoare de anticorpi monoclonali ;
- *incluziogen* — caracteristic unei replicări virale relativ lente şi însoţit, în afară de apariţia incluziilor, de vacuolizări citoplasmatice, citomegalie, sinciţizare etc.

Valoare didactică deosebită are conceptul „*iceberg*" al infecţiei virale, care stabileşte un paralelism sugestiv între modificările citopatice induse de virus în culturi de celule şi simptomatologia clinică a virozelor.

Esențial de reținut este faptul că relațiilor virus—celulă-gazdă, exprimate morfologic, le corespunde o proporție semnificativ mai mare de interacțiuni neproductive, așa cum infecțiile clinic aparente sînt amplificate epidemiologic de infecțiile subclinice (vezi capitolul 14).

Efectul citopatic servește și pentru cuantificarea infectivității virale. Determinările de titru se fac fie prin metode statistice (Reed și Muench, Kaerber) fie prin metode cuantale, în care caz se estimează centrii infectanți sau plajele viral-induse.

7.3.4. LEZIUNI CROMOZOMIALE DETERMINATE DE VIRUSURI

Studiul relațiilor dintre virusuri, cromozomi, carcinogeneză a evidențiat apariția de leziuni cromozomiale în leucocitele pacienților cu viroze acute (herpes, varicelă, rujeolă etc.). Ulterior, modificări similare au fost reproduse *in vitro*, în culturi de celule, precizîndu-se că replicarea virală nu este absolut necesară pentru afectarea cromozomilor. Proteine structurale virale (de exemplu, factorul hemolitic/sincițizant, în cazul paramyxovirusurilor) sînt implicate în producerea leziunilor cromozomiale care apar și în culturi nesusceptibile. Totuși, amploarea și frecvența leziunilor în cazul unei infecții productive sînt semnificativ mai mari. Tipurile anomaliilor cromozomiale induse de virusuri sînt următoarele (Stich și Yohn, 1970) :

— aberații cromozomiale (fragmentări, pulverizații, rupturi, schimburi cromatidiene) ;

— anomalii ale aparatului mitotic (mitoze multipolare, *colchicine-like mitosis*) ;

— cariotip anormal cu complement instabil sau stabil ;

— policariocite.

Frecvența leziunilor estimate este cu atît mai mare, cu cît se folosesc metode mai sofisticate de examinare. Tehnicile de bandare au stabilit sensibilitatea mai mare a cariotipurilor patologice la acțiunea virusurilor. De asemenea, a devenit evident că localizarea leziunilor nu este întîmplătoare, ci anumite grupe de cromozomi sînt mai susceptibile. Odată cu evoluția cromozomilor spre structuri complicate, potențialul apariției rearanjărilor intra- sau intercromozomiale (translocații) sporește : în paralel crește semnificația acestor alterări pentru patologie.

Așa-numitele *„pulverizații cromozomiale“* sînt entități citologice deseori eronat interpretate. Ele au fost descrise de Nichols (1962), ca rezultat al acțiunii virusurilor *in vivo* sau *in vitro*. Termenul a fost extins la modificările observate în celule fuzionate ca urmare a replicării virale, ceea ce a creat confuzii. Este important să separăm pulverizațiile cromozomiale, care afectează unii dintre cromozomii unei celule și constau din rupturi, *gaps*-uri, translocații etc. (fig. 7-2), de modificările cromozomiale observate în celule fuzionate. Multe virusuri induc policariocite iar fuziunea unor celule heterofazice este urmată de sincronizarea internucleară cu apariția unor condensări cromozomiale premature. Cernescu și Rojanski (1981) au găsit astfel de leziuni în infecții virale persistente. Cînd o celulă în metafază fuzionează cu una în interfază are loc feno-

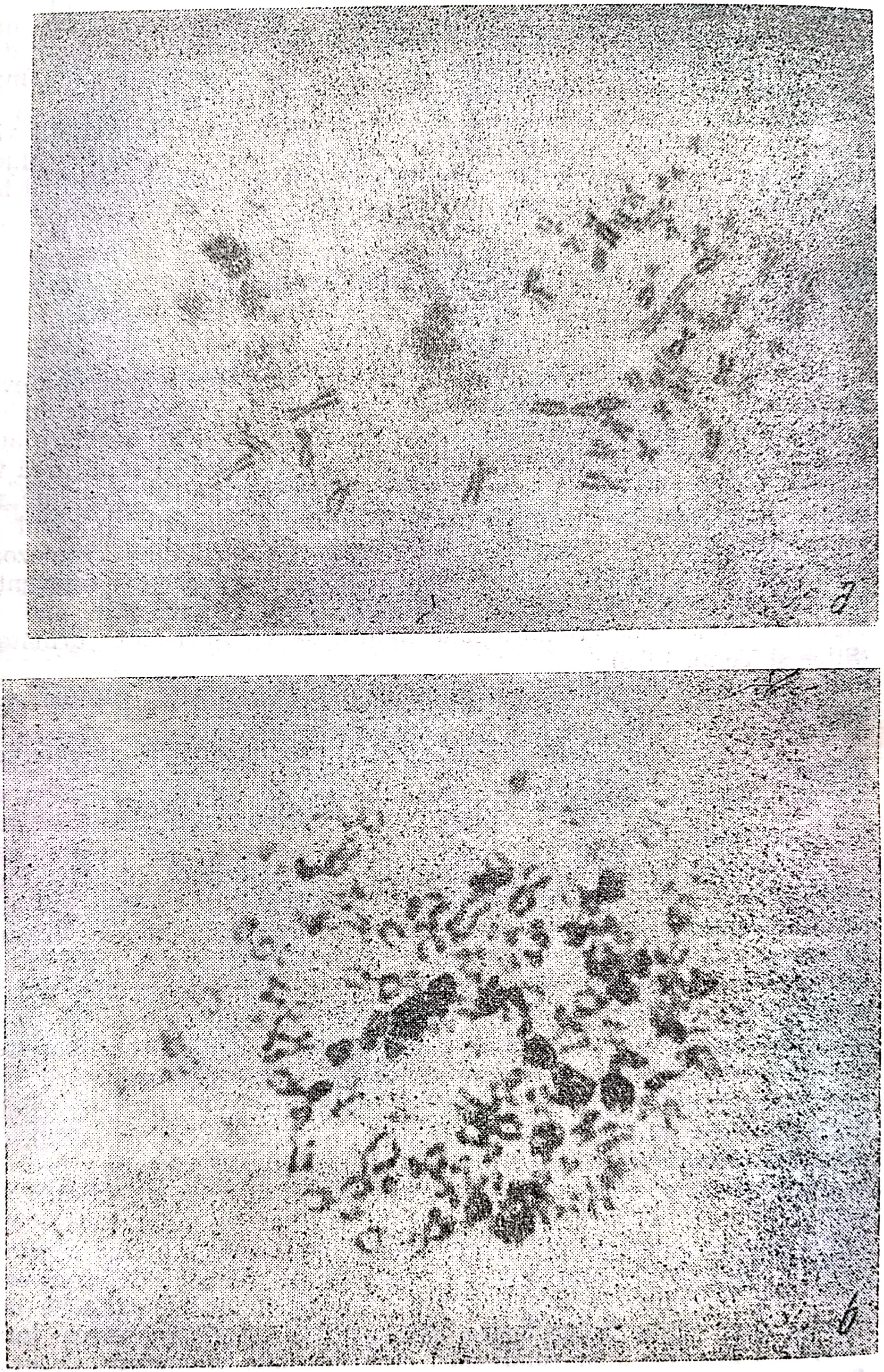
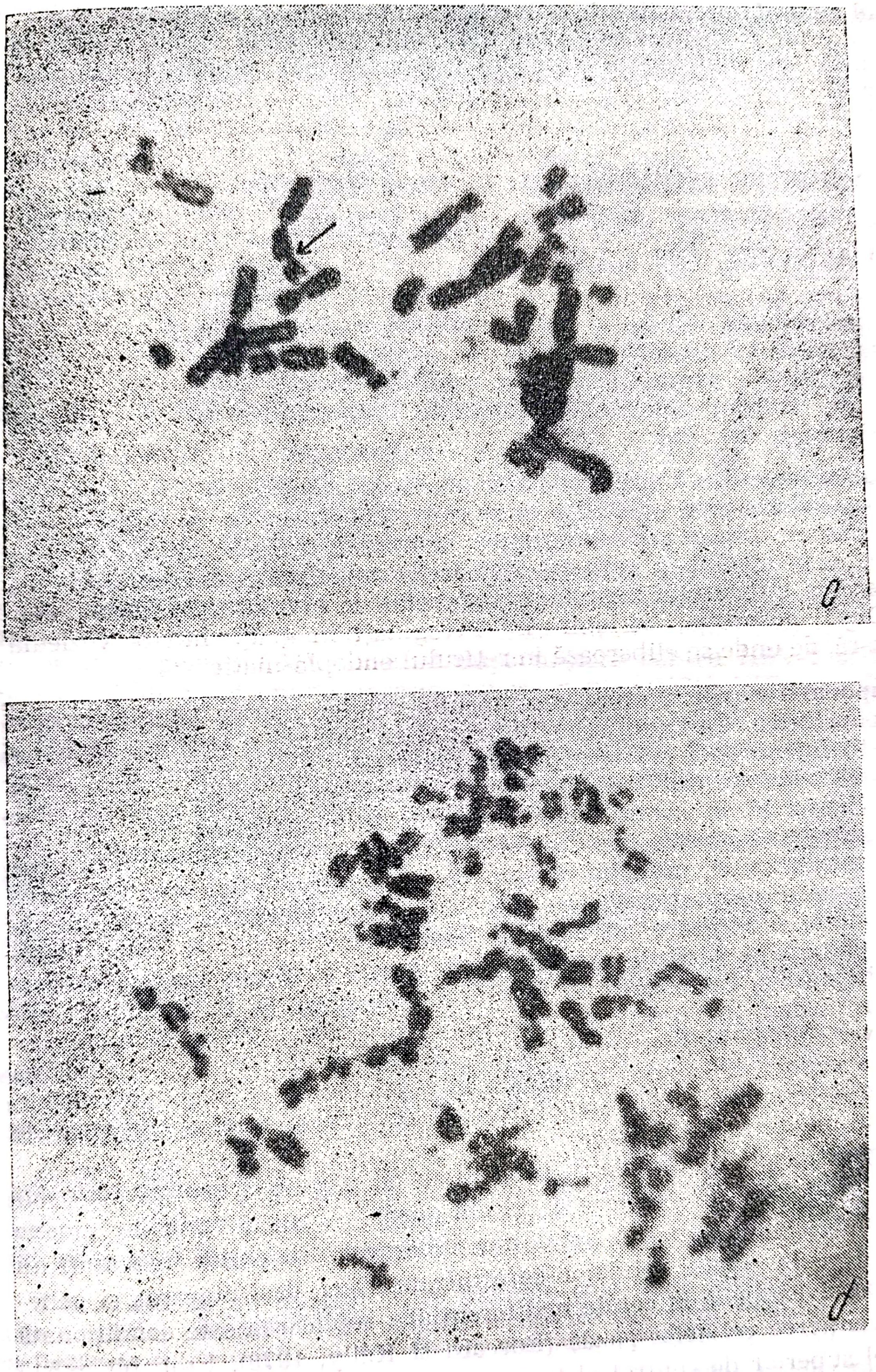


Fig. 7-2 — Leziuni
a — condensări cromatiniene ; *b* — despiralizări ;



cromozomiale viral-induse.
c — fractură cromatidiană ; *d* — pulverizație.

menul de profazare, adică de pulverizare cromozomială prematură. Detectarea acestor modificări este sugestivă pentru etiologia virală, pentru că virusurile sau subfracțiunile lor sînt cauza cea mai comună a fuziunilor celulare.

7.4. ASPECTE MORFOLOGICE, BIOCHIMICE ȘI BIOFIZICE ALE INVAZIEI VIRALE LA NIVEL CELULAR

Specificitatea chimică a interacțiunii virus — receptor nu explică spectrul uneori foarte larg al gazdelor susceptibile. Analiza stadiilor timpurii ale invaziei virale în cazul mai multor familii elucidează factorii adiționali, biofizici, biochimici și biologici semnificativi pentru inițierea și desfășurarea infecției.

Parvovirusurile. Un aspect particular legat de internalizarea particulelor parvovirale este existența unei etape de clivare a proteinei structurale majore, proces care determină activarea adsorbției. Clivarea se produce și în mediul în care au fost cultivate celulele susceptibile, ceea ce sugerează intervenția unor factori secretați la nivelul membranei celulare. După adsorbție, virionii sînt invaginați în grup într-o veziculă pinocitară, de unde se eliberează în reticulul endoplasmatic.

Papovavirusurile. Natura receptorului celular pentru papovavirusuri este lipoproteică. Ca rezultat al adsorbției se notează o creștere rapidă a fluidității membranei celulare, invers decît ceea ce se produce în cazul adsorbției unor virusuri sincițizante cu anvelopă (paramyxovirusuri). Papovavirusurile nu conțin lipide, astfel încît modificarea fluidității nu poate fi atribuită amestecului lipidelor celulare și virale, ci activării unor enzime membranale, probabil declanșată de procesul pinocitar. Creșterea fluidității este proporțională cu numărul virionilor adsorbiți și pregătește condițiile necesare anvelopării particulelor virale de către membrana celulară în vezicule pinocitare. În aceste vezicule virionii traversează citoplasma, fuzionează cu membrana nucleară și, în final, sînt eliberați în nucleu. S-a postulat existența unui factor nuclear de recunoaștere a veziculelor purtătoare de virus, de natură histonică. Pătrunderea directă a papovavirusurilor în nucleu este diferită de a adenovirusurilor. Ultimele suferă modificări structurale și antigenice ireversibile încă de la nivelul membranei celulare.

Inițierea ciclului replicativ propriu-zis al papovavirusurilor este legată de gradul de diferențiere a celulei-gazdă. Virusul verucilor umane se poate atașa și de epiteliul bazal, dar eliberarea progenilor infectanți nu se face decît la nivelul celulelor keratinizate. Deci, deși atașarea și penetrarea pot avea loc și în celule nediferențiate, replicarea este condiționată de diferențierea celulelor-gazdă (Boocara și Kelly, 1978). Probabil există un nivel superior de control al tropismului situat în membrana nucleară. Celălalt nivel, pe membrana celulară, este ilustrat de existența celulelor permisive transformate cu SV40, rezistente la superinfecţie. Rezistenţa a fost explicată prin blocarea receptorilor sau alterarea lor.

Adenovirusurile. Complexul capsidar al fibrelor pentonice mediază ataşarea adenovirusurilor la substrat. Natura receptorului celular nu este definitiv stabilită însă unele date experimentale indică un constituent al tonofilamentelor. După Philipson şi colab (1976), se desfăşoară următoarea succesiune de evenimente : *a)* ataşarea fibrelor pentonice la receptori ; *b)* aglomerarea altor receptori adiacenţi ; *c)* formarea unui complex multivalent virus — receptor ; *d)* inducţia pinocitozei ; *e)* eliberarea virionilor încă încapsidaţi în citoplasmă ; *f)* ataşarea la microtubuli şi migrarea vectorială către porii nucleari. Pătrunderea în nucleu este însoţită de decapsidare. Deci, în cazul adenovirusurilor, ca şi în cazul altor familii de virioni lipsiţi de anvelopă, invazia celulară este directă. Procesele de la nivelul membranei celulare (independente de temperatură şi de aportul energetic) au importanţă minoră în cazul adenovirusurilor.

Herpesvirusurile. Complexitatea structurală, atît genomică, cît şi a păturilor de înveliş ale virusului herpetic, explică varietatea biologică a relaţiei virus—gazdă. În esenţă, aceasta se reduce la posibilitatea stabilirii a două tipuri de infecţii : latente sau productive.

Pentru toate herpesvirusurile, sediul replicării active este celula epitelială ; sediul latenţei este neuronul sau, în cazul virusului Epstein-Barr, limfocitele B. Această segregare este dependentă de vîrstă : ea este abolită *in utero* pentru CMV, imediat după naştere pentru HSV-1 şi 2, la orice vîrstă în cazul imunosupresiei severe pentru HSV, VZV sau CMV.

Multitudinea de receptori pentru virusurile herpetice implică anumite caractere evolutive ale infecţiei. Mai ales *in vivo* trebuie ţinut seama şi de receptorii imuni viral-induşi (Fc). Între elementele caracteristice infecţiei herpetice la nivel celular menţionăm :

— asincronismul iniţierii infecţiei, condiţionat de fazele diferenţierii celulare ;

— evoluţia diferenţiată a replicării în funcţie de stadiile maturării celulare ;

— expresia genomului viral odată internalizat poate facilita penetrarea ulterioară şi a altor virusuri ;

— dacă iniţial adsorbţia şi penetrarea (prin viropexie) sînt specificate de receptori, tardiv pot fi internalizate şi particule neanvelopate sau prin fuziunea limfocitelor B conţinînd genomul viral integrat cu celulele epiteliale (Glaser şi colab., 1976).

Aceste date indică existenţa unor factori adiţionali, în afara receptorilor celulari, care determină susceptibilitatea la infecţia herpetică. Aceeaşi problemă se pune şi în cazul carcinogenezei herpetice : agentul viral acţionează singular sau coroborat cu alţi carcinogeni ?

Poxvirusurile au ilustrat între primele cele două alternative de invazie a celulei de către virioni : prin viropexie sau prin fuziune. Ponderea fiecăreia este diferită în funcţie de sistemul virus—gazdă însă ambele par a fi operante la foarte diferitele gazde ale poxvirusurilor : plante, vertebrate şi nevertebrate.

Trecerea în revistă a poxvirusurilor care infectează celule umane sau ale altor vertebrate a relevat că membrana externă a virionului conține lipoproteine virale și glicoproteine care nu diferă după natura substratului de cultivare. Aceste componente sînt specificate de genomul viral, de unde spectrul de gazdă extrem de larg al poxvirusurilor.

Picornavirusurile. Interacțiunea virus — receptor în cazul picornavirusurilor este dependentă de temperatură și de aportul energetic. Consecutiv acestei interacțiuni se produc alterări ireversibile ale capsidei virale. Pierderea unor proteine capsidare se traduce prin modificări antigenice ale virionilor (particulele A), care nu mai sînt recunoscuți de anticorpii specifici.

Mandel (1967) a arătat că poliovirusul de tip 1, neutralizat cu anticorpi 7 S, reține capacitatea de a se adsorbi la celulele susceptibile. După adsorbție, virusul neutralizat penetrează prin viropexie în același fel ca și virionul necomplexat cu anticorpi. În continuare, decapsidarea conduce însă la rezultate diferite. În cazul virionului necomplexat se eliberează ARNm viral integru, în cazul complexului virus — anticorp ARNm eliberat este degradat. Particulele A au o natură lipofilică, ceea ce explică penetrarea directă a poliovirusurilor. De asemenea, particulele A, dar nu virionii intacți, pot fi adsorbiți la lipozomi care conțin fosfatidilcolină sau alte lipide și, în această formă, pot penetra în celulele care nu sînt susceptibile la virus

Reovirusurile. Proteina capsidară externă — sigma 1 —, care constituie și hemaglutinina reovirusurilor, a fost identificată ca mediatorul principal al atașării virale. Atașarea se poate desfășura și la 4°C, însă penetrarea, care se produce prin fagocitoză, are loc numai la 37°C. Decapsidarea se efectuează în lizozomi.

Rotavirusurile, clasificate între reovirusuri, au un tropism specific pentru celulele epiteliale intestinale. S-a sugerat că lactaza (cu concentrații mai mari în epiteliul sugarilor) are o funcție dublă, de receptor și de enzimă de decapsidare. În contrast cu reovirusurile, care sînt decapsidate de proteozele intracelulare, rotavirusurile pot fi decapsidate numai de lactază (Holmes și colab., 1976).

Togavirusurile. Inițierea infecției cu togavirusuri evidențiază cîteva particularități în raport cu celelalte virusuri anvelopate. În primul rînd, ciclul biologic care include atît gazda vertebrată, cît și gazda nevertebrată reclamă existența unor receptori diferiți. În ceea ce privește virusul Semliki Forest, Helenius și colab. (1978) au identificat receptorul celulelor umane în antigenele de histocompatibilitate (HLA-A și HLA-B). Glicoproteinele anvelopei virale reacționează cu acest receptor, însă penetrarea — prin viropexie — este de un tip special. Sînt internalizate particule virale nemodificate, prelucrate însă de activarea unor sisteme enzimatice cantonate în membranele celulare.

În general, există o serie de asemănări între togavirusuri și virusurile neanvelopate în aceste faze timpurii ale replicării. Condițiile ambiante influențează sensibil atît penetrarea, cît și fazele finale ale maturării. Într-un mediu cu osmolaritate redusă, ambele procese sînt întîrziate.

Rhabdovirusurile. Spectrul larg de gazdă al virusului stomatitei veziculoase sau al virusului rabic sugerează că receptorul celular pentru ele este un constituent comun al membranelor celulare. Pentru VSV s-a propus drept receptor o lipoproteină iar pentru virusul rabic, receptorii pentru acetilcolină de la nivelul plăcii neuromotorii.

Viropexia este o etapă obligatorie în inițierea infecției. Deși adsorbția virionilor la receptori are loc și la 4°C, fagocitarea lor se produce numai la 37°C. Antigenele virale rămîn, de regulă, în anumite zone ale membranei celulare, delimitate de segmente de membrană care nu cuplează anticorpii antivirali. Rhabdovirusurile nu au factor de fuziune și difuzarea virionilor pe toată suprafața celulelor infectate este asigurată numai de amestecul lipidelor anvelopei virale și ale membranei celulare, amestec posibil conform modelului mozaicului fluid al structurii membranei (fig. 7—3).

Interesant de menţionat că învelirea vironilor VSV cu pelicule unilamelare artificiale, compuse din fosfatidilcolină (Moore și colab., 1978), conduce la pierderea infectivității, probabil prin compromiterea penetrării. Pe de altă parte, infecția mixtă a VSV cu un alt virus (rujeolic, de exemplu, care are factor de fuziune) produce progeni cu caractere fenotipice ale ambilor parentali. Se pot forma virioni cu structuri mixte ale anvelopei (pseudotipuri), care au posibilitatea atașării la celulele susceptibile pentru ambele virusuri. În acest fel, infecții mixte pot reactiva infecții latente sau neproductive.

Orthomyxovirusurile. În legătură cu virusul gripal, Fazekas de St. Groth a propus, încă în 1948, termenul de „viropexie" pentru a descrie pătrunderea virionilor intacți prin membrana celulară printr-un proces endergonic, echivalent fagocitozei. Cunoștințele ulterioare asupra mecanismului endocitozei au permis lărgirea noțiunii și la celulele nefagocitare. Viropexia este procesul de internalizare a virionilor, declanșat de atașarea lor ireversibilă la receptorii celulari. Fenomenul pare a fi comun pentru toate virusurile. În plus, virusurile anvelopate (ortho- și paramyxovi-

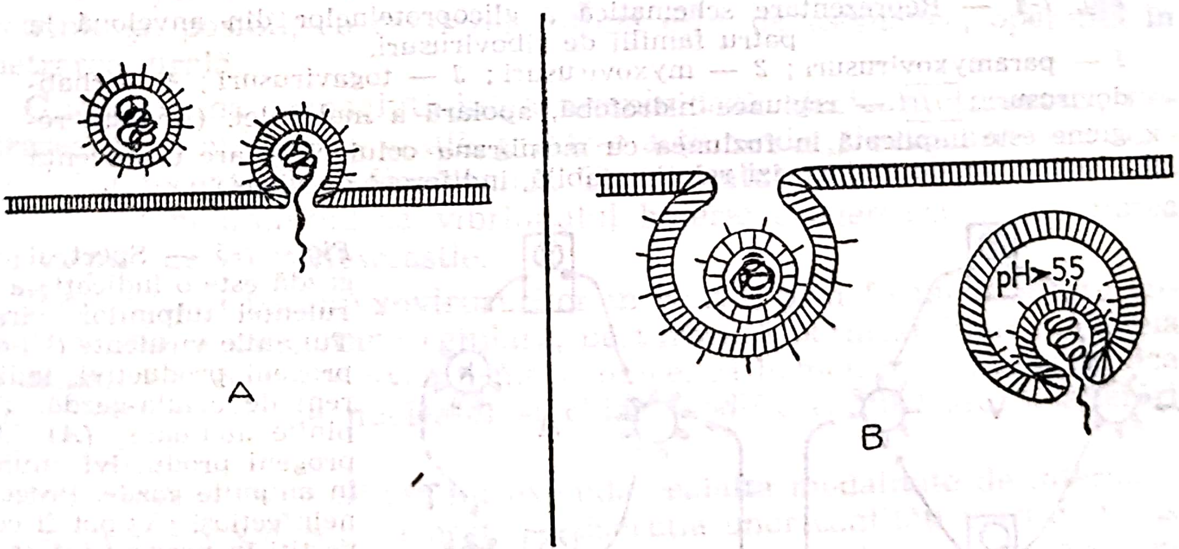


Fig. 7-3 — Diferite modalități de penetrare a virusurilor cu anvelopă. *A* — fuziunea independentă de pH (exemplu : paramyxovirusuri) ; *B* — endocitoză dependentă de pH (exemplu : myxo- sau rhabdovirusuri).

rusurile, rhabdo- și togavirusurile etc.), datorită includerii în structura externă a unei pături lipidice, pot penetra și printr-un proces de fuziune cu membrana celulară.

Hemaglutinina virusului gripal este principalul mediator al atașării virionilor la receptorii sialoglicoproteici [în esență, acidul N-acetilneuriminamic (NANA)] ai eritrocitelor sau celulelor nucleate. Grupările funcționale ale hemaglutininei care sînt implicate în atașare nu au fost precizate. Glicoproteinele din alcătuirea proiecțiilor anvelopei virale sînt transmembranale, cu segmentul hidrofob la exterior. De obicei, aceste glicoproteine sînt sintetizate ca precursori, ele devenind funcționale numai în urma unui clivaj proteolitic realizat de enzime celulare. Activitățile hemaglutinantă, neuraminidazică, hemolitică, de fuziune celulară și chiar infectivitatea sînt dependente de realizarea acestui clivaj. Este un exemplu de complementare a funcțiilor genomului viral și celular în determinarea patogenității. Fuziunea și, prin aceasta, inițierea infecției sînt compromise în cazul nerealizării clivajului. Clivajul nu depinde numai de disponibilitatea proteazelor gazdei, ci și de factori virali specifici, exprimați în secvența aminoacizilor din segmentul de ancorare a proiecțiilor pe anvelopa virală. Aceste secvențe asigură situsuri de clivare potrivite acțiunii proteazelor gazdei (fig. 7-4 și 7-5).

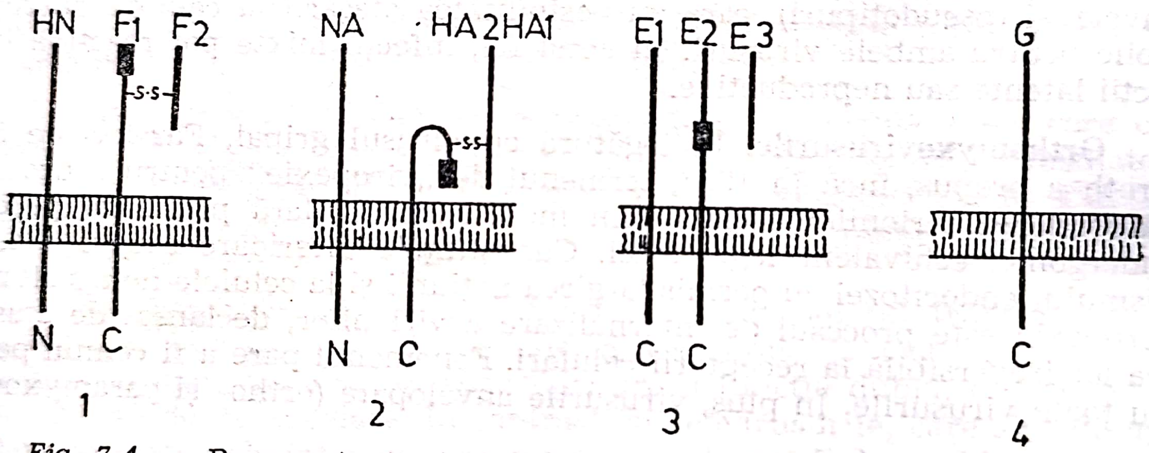


Fig. 7-4 — Reprezentare schematică a glicoproteinelor din anvelopă la patru familii de ribovirusuri.
1 — paramyxovirusuri ; *2* — myxovirusuri ; *3* — togavirusuri ; *4* — rhabdovirusuri ; ▨ — regiunea hidrofobă, apolară a moleculei. (Această regiune este implicată în fuziunea cu membrana celulară și are o secvență de aminoacizi relativ stabilă, indiferent de virus.)

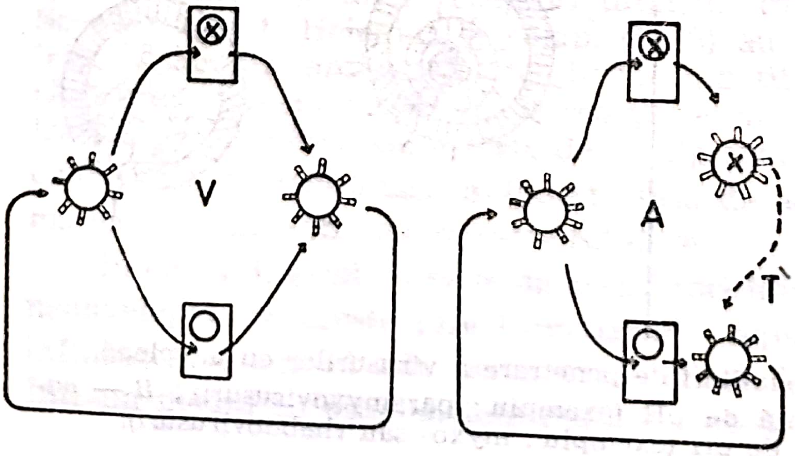


Fig. 7-5 — Spectrul de gazdă este o indicație a virulenței tulpinilor virale. Tulpinile virulente *(V)* dau progeni productivi, indiferent de celula-gazdă. Tulpinile atenuate *(A)* dau progeni productivi numai în anumite gazde. Progenii neinfecțioși *(X)* pot fi convertiți în progeni infecțioși prin clivajul proteolitic al glicoproteinelor de înveliș cu tripsină *(T)*.

Există diferențe în spectrul de gazdă al diferitelor tulpini virale, determinate de susceptibilitatea glicoproteinelor la proteazele gazdei. Pentru tulpinile atenuate sînt permisive puține celule-gazdă, numai acelea care pot cliva eficient precursorii glicoproteinelor din anvelopă. Pentru tulpinile patogene, clivajul este eficient în majoritatea celulelor-gazdă, așa încît progenii au toate atributele patogenității.

Infectivitatea virusului gripal crește după digestia proteolitică efectuată artificial cu tripsină. Această prelucrare influențează fuziunea virusului cu membrana celulei-gazdă. În continuare urmează rapid decapsidarea și inițierea replicării virale.

Există multe probleme nelămurite legate de influența etapelor inițiale ale interacțiunii virus — gazdă asupra patogenității tulpinilor gripale. De exemplu, virusurile gripale umane se replică numai în celulele epiteliului respirator. Virusurile gripale aviare se pot replica și în celulele tractului intestinal. Se pare că nu numai inserția glicoproteinelor virale la celule în cursul adsorbției este importantă, ci și procesul de maturare și eliberare a virionilor progeni. Acest ultim aspect este dominat de maturarea progenilor pe domenii restrînse ale membranei celulare, care determină, pe de o parte, proprietățile progenilor rezultați, pe de altă parte, accesibilitatea efectorilor imuni la componentele virale. Ambele aspecte sînt importante și pentru desfășurarea infecției gripale naturale.

Paramyxovirusurile. Proiecțiile anvelopei paramyxovirusurilor conțin în aceeași moleculă glicoproteică atît substratul activității hemaglutinante, cît și al celei neuraminidazice (cînd aceasta din urmă există). O altă glicoproteină, factorul de fuziune, care formează o categorie distinctă de proiecții, mediază intrarea paramyxovirusurilor în celulele susceptibile.

Receptorii celulari sînt reprezentați de moleculele de glicoforină, care traversează membrana citoplasmatică. Porțiunea aminoterminală a glicoforinei conține toate secvențele de hidrați de carbon, inclusiv NANA, fiind expusă la exteriorul membranei. Porțiunea opusă, carboxiterminală — ancorată în pătura lipidică bistratificată — interacționează cu complexul spectrinic și, posibil, cu catalaza. Ultima este, de asemenea, operantă în penetrarea virală.

Glicoproteina hemaglutinină/neuraminidază afectează adsorbția, penetrarea, ca și eliberarea virală, printr-o acțiune de „demascare" sau „expunere" a receptorilor glicoforinici. Tratamentul unor celule puțin susceptibile cu neuraminidaza vibrionului holeric exagerează infectivitatea unor tulpini de virus Newcastle.

Pătrunderea paramyxovirusurilor în celulă, prin fuziunea dintre anvelopa virală și membrana celulară, perturbează permeabilitatea acesteia din urmă, ceea ce poate avea urmări toxice, ca hemoliza (la hematii), liza „din afară" (la celule nucleate) și chiar modificări nucleare și alterări cromozomiale.

Penetrarea prin fuziune nu exclude cealaltă modalitate de internalizare, prin viropexie. S-a sugerat că adsorbția unor cantități mari de virus prin fuziune (la multiplicități de inoculare excesive) este un fenomen autolimitant. Totuși, celula nu este saturată, căci modificările induse de fuziune, respectiv descreșterea fluidității lipoproteinelor membranale, fac operantă în continuare viropexia. Printr-un astfel de mecanism se poate explica forțarea susceptibilității unor celule cu multiplicități de inoculare înalte, pe de o parte, și, pe de altă parte, infectivitatea similară a unor tulpini cu capacitate de fuziune diferită.

Studii electronooptice combinate cu detectarea antigenului cu anticorpi marcați cu peroxidază au lămurit, în cazul virusurilor respirator sincițial și rujeolic, secvența evenimentelor timpurii ale infecției. Consecutiv adsorbției (la 37°C), anvelopa virală și membrana celulară fuzionează, apoi antigenele virale dispersează în regiunile adiacente ale membranei, întreaga celulă devenind specific reactivă cu anticorpii antivirali marcați. Această difuziune explică cel puțin două fenomene : starea refractară a celulei la fuziunea cu alte virusuri și difuzarea infecției din aproape în aproape, prin antrenarea celulelor vecine în procesul de sincițizare. Sugestiv pentru modul de acțiune al efectorilor umorali ai imunității este fenomenul de aglomerare polară a antigenelor virale, consecutiv acțiunii anticorpilor antivirali dar și a anticorpilor anticelulari (de exemplu, anticorpii antispectrină). Acest ultim aspect, al modulării expresiei antigenelor virale la suprafața celulelor infectate, este deosebit de important în inițierea infecțiilor persistente.

Retrovirusurile. Retrovirusurile sînt cunoscute în prezent ca agenți etiologici ai unor leucemii și limfoame la animale și la om. Ele constituie cel mai promițător model pentru descifrarea mecanismelor leukemogenezei (Gallo și Wong Sthal, 1982).

Retrovirusurile endogene sînt transmise în linie germinală, vertical și nu par a fi patogene. Retrovirusurile exogene produc tumori în infecțiile acute sau cronice. Hibridarea moleculară a evidențiat rolul etiologic al retrovirusurilor în limfoame și leucemii umane (limfoame cu celule T, sindrom Sézary, leucemie cu celule „în arici"). Comun pentru retrovirusuri este existența genelor *onc* responsabile pentru inducția rapidă a tumorilor *in vivo* și a transformării celulare *in vitro*. Toate genele *onc*-virale (v-*onc*) derivă din gene celulare normale ale gazdei (c-*onc*). O astfel de genă este responsabilă de sinteza la om a factorului de creștere a celulelor T (TCGF). Adăugat în mediul de cultură, TCGF permite creșterea pe termen lung *in vitro* a limfocitelor T normale sau neoplazice. Dintr-o linie tumorală T s-a izolat primul retrovirus uman (Poiesz, 1980). Un concept recent asupra oncogenezei virale susține integrarea unui provirus retroviral adiacent la o genă celulară potențial oncogenă (c-*onc*).

Trecerea în revistă a etapelor timpurii ale interacțiunii virus — gazdă în cazul principalelor familii virale permite evidențierea unor niveluri diferite de reglare. În primul rînd, adsorbția și penetrarea, inițiate de interacțiunile virus — receptor, au loc prin două mecanisme — viropexie și/sau fuziune. Ambii parteneri contribuie la specificitatea acestei reacții, ceea ce are răsunet imediat asupra virulenței și patogenității tulpinilor virale. În al doilea rînd, etapele ulterioare ale replicării depind de gradul de diferențiere celulară, ceea ce sugerează rolul unor funcții nucleare în control. În al treilea rînd, cum s-a semnalat în cazul retrovirusurilor, inserția genomului reverstranscris (provirus) în genomul celular determină, uneori, transformarea malignă. Provirusul se poate integra în situsuri multiple, deci poate cădea sub controlul diverselor gene celulare sau, reciproc, provirusul poate influenţa secvenţele celulare din flancuri, modificînd controlul unor funcţii celulare (teoria inserţiei promotorului).

7.5. EVOLUŢIA GENOMULUI VIRAL ÎN RAPORT CU GAZDA

7.5.1. MODIFICĂRI ÎN GENOMUL VIRUSURILOR ADN

Datele actuale asupra patogenezei virale la nivel molecular evidenţiază adaptarea continuă a genomului viral şi a gazdei, astfel încît supravieţuirea ambilor parteneri să fie asigurată. Expresia selectivă a receptorilor pentru virus pe anumite tipuri de celule, sau pe celule în anumite stadii de diferenţiere, determină un spectru limitat al distrucţiei tisulare viral-induse. Selectiv, pot apărea mutante virale cu spectru de gazdă modificat sau gazde rezistente. Este clasic exemplul introducerii mixomatozei iepurelui (poxvirus) pentru controlul populaţiei excesive de iepuri în Australia (Fenner şi Ratcliffe, 1965). Iniţial, mortalitatea iepurilor era de 99% dar, numai după 7 ani de selecţie, ea a scăzut la 25%. In afara selecţiei naturale a iepurilor rezistenţi, în anumite zone au început să evolueze tulpini virale atenuate. Ambele procese au contribuit la supravieţuirea în continuare atît a virusului, cît şi a gazdei.

O altă posibilitate adaptativă, comună mai ales virusurilor ADN, este latenţa. Herpesvirusurile îşi pot regla în asemenea fel mecanismul replicativ, încît latenţa este un procedeu obişnuit de conservare a genomului lor intr-o stare neinfecţioasă. Reglarea este de natură temporală. Din cele trei clase de gene virale active în infecţiile productive (imediat-timpurii, întîrziat-timpurii şi tardive) numai o parte din prima clasă este exprimată în latenţă. Green şi colab. (1981) au detectat în ganglionii trigeminali ai iepurilor infectaţi latent numai sinteza polipeptidului VmV175, care ţine de gena imediat-timpurie IE3. Latenţa se poate defini în termenii interacţiunii dintre produsele genelor virale şi neuronale. S-a sugerat că polipeptidul VmV175 afectează expresia unor factori neuronali (proteinele de stres) care, la rîndul lor, influenţează expresia proteinelor virale. Modificările metabolice din neuronul infectat sau din neuronii cu care acesta se leagă induc reactivarea genomului viral latent.

Un alt exemplu poate fi luat dintr-un domeniu actual al virusologiei aplicate : utilizarea virusurilor insectelor ca pesticide. Strategia acestei opţiuni constă în inducţia unor epizootii virale cu agenţi care au spectru de gazdă foarte restrîns. Din motive de securitate, este de dorit ca virusul utilizat ca pesticid să se replice numai la specia-ţintă, altfel dezechilibrul ecologic ar putea avea consecinţe nefaste. Familia *Baculoviridae* se replică numai la unele insecte *(Lepidoptera, Hymenoptera)* şi este singura clasă de virusuri utilizată ca agent de control biologic al insectelor. În natură, insectele sînt frecvent infectate latent, inaparent. S-a sugerat că latența este un fenomen adaptativ, de apărare, al insectelor împotriva infecției virale. Deși mecanismul instalării latenței baculovirusurilor nu este lămurit, se poate acționa și aici în vederea controlului ecologic prin activarea infecțiilor latente cu ajutorul unor stimuli fizici sau chimici.

7.5.2. MODIFICĂRI ÎN GENOMUL VIRUSURILOR ARN

Genomul virusurilor ARN are o rată de mutații care întrece cu cîteva ordine de mărime rata de mutații a genomului virusurilor ADN și cea a genomului celular. Datorită mecanismelor polimerazice care asigură controlul și corectarea sintezei ADN („*proof reading*"), erorile nu sînt în acest caz decît de ordinul 10^{-9}—10^{-11}, pe cînd la virusurile ARN, numai de ordinul 10^{-4}—10^{-5}. Frecvența înaltă a erorilor în transcriere este suportul plasticității genetice a virusurilor ARN.

Capacitatea de evoluție a virusurilor ARN sau capacitatea de acumulare a mutațiilor nu implică instabilitatea lor genetică. Stabilitatea genomului este asigurată de competitivitatea variantelor sălbatice în raport cu a altora apărute incidental. Kew și colab. (1981) au dovedit că multiple modificări genomice pot apărea la tulpinile vaccinante de poliovirusuri după replicarea în tractul intestinal uman atît în urma pasajelor interumane, cît și în urma excreției persistente la un singur subiect. Cu toate acestea, caracterul de nonpatogenitate este păstrat, probabil prin facilitățile replicative ale tulpinilor parentale. În instalarea infecțiilor persistente cu virusuri ARN, generarea particulelor defectiv-interferente (DI) constituie un alt mecanism de evoluție a genomului viral ARN. Competiția replicativă dintre particulele defective și standard asigură o moderare a sintezei de progeni infectanți, caracteristică infecțiilor persistente.

Care sînt avantajele capacității evolutive deosebite a virusurilor ARN? În primul rînd, posibilitatea de eludare a răspunsului imun al gazdei. Aceasta poate avea loc dramatic, ca în cazul recombinanților pandemici de virus gripal, sau se produce lent și constant, în cazul altor virusuri care suferă modificări antigenice minore, sub presiunea selectivă a răspunsului imun al populației în sînul căreia evoluează. De exemplu, Cernescu (1982) a susținut acest mecanism într-o situație particulară: explicarea persistenței virusului rujeolic în panencefalita sclerozantă subacută (PESS). Folosirea anticorpilor monoclonali oferă perspectiva confirmării variațiilor antigenice în multe alte cazuri.

În al doilea rînd, spectrul de gazdă mai larg sau variabil favorizează difuziunea virală. Marea majoritate a virusurilor care se replică eficient la insecte și vertebrate (arbovirusuri) sau la insecte și plante (rhabdovirusuri) sînt virusuri ARN și nu ADN. Fiecare trecere de la artropod la om sau invers, de exemplu în cazul flavivirusurilor, se însoțește de un dezechilibru în populația virală, fiind favorizate variantele cu replicare mai eficientă în ambele gazde. Evenimente similare au probabil loc în cazul virusurilor cu tropsim selectiv, dar variabil, în patogeneză. De exemplu, virusul rabic care se replică succesiv dar restrictiv în celulele musculare, celulele neuronale sau celulele epiteliale ale glandelor salivare.

7.5.3. MODIFICĂRI ÎN GENOMUL SEGMENTAT AL UNOR VIRUSURI

Între virusurile animale, cîteva familii de virusuri ARN au genomul segmentat (tabelul 7-VI), alcătuit din minigenomuri care se pot schimba reciproc cînd două tulpini diferite se replică simultan în aceeași celulă-gazdă. Aceste schimbări se numesc *reasortare* și se deosebesc de *recombinare* (cu care adesea sînt greșit confundate) prin faptul că, în ultimul caz, există rupturi și alipiri ale lanțurilor nucleotidice.

TABELUL 7-VI

Virusuri animale ARN cu genom segmentat

Familia	Tipul de ARN	Sensul replicativ	Număr de segmente
Arenaviridae	ss	—	2
Birnaviridae	ds	±	2
Bunyaviridae	ss	—	3
Orthomyxoviridae	ss	—	7—8
Reoviridae	ds	±	10—12
Retroviridae	ss	+	2

În ciuda frecvenței mari a reasortărilor posibile, rezultatul nu este întîmplător, pentru că supraviețuiesc numai fenotipurile care prezintă vreun avantaj selectiv. Acest avantaj se reflectă fie într-o antigenicitate modificată, fie într-un tropsim tisular particular etc. Reasortarea este, pe lîngă un model inestimabil pentru studiul patogenității virale la nivel molecular, un proces natural. Datele biochimice privind emergența tulpinilor gripale cu antigenicitate modificată indică reasortarea ca una din cauze. Reasortarea la virusurile gripale este numai intratipică iar rezultatele ei nu au totdeauna o semnificație epidemiologică. La reovirusuri, reasortarea poate fi și intertipică, ceea ce a permis obținerea unor rezultate certe privind rolul unora dintre fragmentele genomice în virulență. Spre exemplu, gena care codifică proteina sigma 1 este implicată în tropismul celular și tisular. Proteina sigma 1 a reovirusului de tip 3 condiționează tropismul pentru celulele de tip beta ale pancreasului endocrin și, de aici, proprietăți diabetogene ; proteina sigma 1 a reovirusului de tip 1 nu are asemenea caracteristici.

Modificarea tropismului viral prin reasortare genetică constituie un instrument cu virtuți aplicative remarcabile. Unele segmente genomice ale tulpinii gripale A/PR/8/34 condiționează replicarea productivă în oul de găină embrionat. Transferul acestor segmente la tulpini recent izolate menține antigenitatea actuală, dar le înzestrează cu capacitate de replicare înaltă în oul de găină embrionat, ceea ce este foarte important pentru producția de vaccin gripal. Asemănător, introducerea unor segmente genomice care condiționează replicarea în culturi de celule a unor rotavirusuri umane (Greenberg și colab., 1981) a facilitat metodologia diagnosticului clinic.

7.5.4. VARIANTE VIRALE CU SEMNIFICAȚIE CLINICĂ

Un fapt binecunoscut este capacitatea aceluiași virus de a determina manifestări clinice diferite. De exemplu, infecția cu virusul Coxsackie B4 poate determina meningoencefalită, miocardită, hepatită, pleurodinie epidemică, faringită și, probabil, unele cazuri de diabet. Mult timp nu a fost clar dacă aceste șase boli diferite sînt datorate unor variante naturale sau întîmplării care face ca virusul să vizeze un anumit organ. Serologia convențională cu seruri hiperimune nu a demonstrat diferențe antigenice între izolatele diferitelor forme clinice. Recent, Prabhakar și colab. (1982), cu un set de anticorpi monoclonali, au pus în evidență frecvența înaltă a variantelor antigenice printre tulpinile Coxsackie B_4 izolate din infecțiile naturale. Mai mult, variante antigenice au fost izolate din organe diferite ale aceluiași individ în cursul unei singure infecții. Diversitatea antigenică minoră este o caracteristică a multor virusuri și semnificația sa clinică este departe de a fi lămurită în detalii.

Variantele virale selectate în raport cu un alt criteriu — morfologia plajelor — s-au dovedit, experimental, capabile de a produce boli diferite. De exemplu, Shibuta și colab. (1982), lucrînd cu virusul parainfluenza 3, au selectat trei variante : una producea boală acută cu atrofia organelor limfoide și moarte, celelalte două determinau o infecție cronică cu hidrocefalie.

S-a sugerat, cel puțin în unele situații, că mecanismul molecular al patogenității diferite implică modificări structurale în polipeptidele anvelopei sau capsidei virale. O relație particulară virus — celulă-gazdă, care devine determinantă în expresia patogenității, este condiționată de capacitatea proteazelor celulare de a asigura prelucrarea prin clivaj proteolitic a unor glicoproteine virale. În cazul virusului bolii Newcastle, izolatele cu hemaglutinina care poate fi clivată sînt virulente pentru puii de găină, celelalte nu.

Probabil că nu toate variantele antigenice sînt semnificative din punctul de vedere al patogenicității. Variantele care implică expresia unor noi determinanți antigenici ce recunosc receptori celulari ignorați în mod obișnuit au cu siguranță o virulență diferită. Generarea variantelor antigenice poate influența evoluția bolii clinice și într-un alt mod. De exemplu, în cursul bolii Visna, care produce la oi o infecție neurologică cronică, se pot izola, de la același subiect, variante antigenice care rezultă în urma efectului presor exercitat de răspunsul în anticorpi specifici față de inoculul original. Menținerea persistenței virale, în ciuda răspunsului imun adecvat, poate fi explicată prin devierea sau alunecarea antigenică a progenilor în raport cu fenotipul parentalilor.

Identificarea variantelor antigenice, chiar în cazul unor virusuri recunoscute ca monotipice (virusul rujeolic, virusul rabic), ridică probleme de perspectivă referitor la eficiența în viitor a aplicării monotone a unei singure tulpini vaccinante. De exemplu, în prezent, unele insuccese ale vaccinării antirabice sînt explicate nu prin lipsa de imunogenitate a vaccinurilor folosite, ci prin apariția în natură a unor variante care diferă antigenic de tulpina vaccinată. Se conturează premisele ca folosirea anticorpilor monoclonali să furnizeze informații care să conducă la o nouă subgrupare și reclasificare a unor virusuri aparent bine studiate.

7.6. PATOGENIA UNOR VIROZE UMANE MAJORE

Considerînd organismul uman în ansamblu drept țintă a infecției virale, nu trebuie ignorate următoarele aspecte care au un rol determinant în expresia patogenității diferite în fiecare caz de interacțiune virus—organism-gazdă. Între acestea menționăm : criteriile de patogenitate pentru tulpini virale cu virulență diferită, depășirea barierelor naturale de rezistență nespecifică, replicarea și difuziunea virusului în organism (tropismul tisular), depășirea mecanismelor imune de apărare, producerea leziunilor tisulare, producerea leziunilor asupra produsului de concepție, exacerbarea altor alternative patogenice și promovarea unor infecții latente.

7.6.1. INFECȚIA GRIPALĂ

Natura multifactorială a virulenței tulpinilor de virus gripal a fost amplu documentată de studiul reasortanților genetici. În virulență nu pot fi implicate numai unele segmente genomice, ci există o constelație de determinanți ai virulenței. Parte din ei pot fi prezenți și la tulpini atenuate, de aceea din doi parentali atenuați pot rezulta progeni virulenți. Acest fapt introduce o limitare în folosirea vaccinurilor atenuate vii.

Reasortarea genomică în natură a fost ilustrată de apariția unor tulpini gripale pandemice din parentali umani și animali. Palese și Kingsburg (1983) au argumentat că tulpinile pandemice H3N2 au rezultat din parentali umani de tip H2N2 și animali cu hemaglutinina de tip H3. Reasortarea se poate produce și între tulpini umane care circulă concomitent sau între tulpini vaccinante vii și tulpini circulante. De exemplu, în 1978 circulau concomitent tulpini A/H1N1 și A/H3N2. Recombinanți cu virtuți epidemice au rezultat din reasortarea celor patru minigene ale complexului polimerazic (P1, P2, P3 și NP) ale virusurilor H3N2 cu genele H, N, M și Ns ale tulpinilor H1N1. Mai puțină atenție s-a acordat semnificației fiecărui segment în parte pentru virulență. Segmentele 4 (H) și 6 (N) sînt implicate în infectivitatea la om, animal și în culturi de celule. Nu se cunosc însă relații între capacitatea unor tulpini de a determina infecții pneumonice, febră prelungită, complicații neurologice sau alte manifestări clinice severe și structura genomului.

În prezent, există caracterizate tulpini atenuate și virulente de virus gripal. Criteriile nominalizării sînt, de regulă, cele clinice — severitatea simptomatologiei apreciată la voluntari. Măsura în care markeri *in vitro* pot fi corelați cu patogenitatea este discutabilă. Dintre acești markeri, o oarecare valoare orientativă au : replicarea în culturi de organ din căi respiratorii (epiteliu nazal, trahee, bronhii), inhibiția mișcării cililor epiteliului respirator, capacitatea de replicare la temperatură supraoptimală, termosensibilitatea etc.

Virusurile gripale accedă în organism prin epiteliul respirator. Elemente cum ar fi : bariera mucociliară, competiţia cu alte microorganisme comensuale, alte mecanisme inflamatoare trebuie depăşite pentru a se iniţia infecţia. Cu tulpinile virulente, la om, s-a demonstrat prezenţa timpurie a antigenului gripal în celulele ciliate, intermediare şi bazale ale epiteliului nazal, dar nu în celulele bronşice. Numai în pneumonii, în cazuri izolate, s-a evidenţiat antigenul gripal în celulele alveolare şi în macrofagele alveolare. Virusul gripal se adsoarbe preferenţial pe celulele ciliate. Aceasta se produce chiar cînd aerosolii viruliferi ajung şi în alveole. Deşi în tractul respirator inferior pot apărea condiţii care să faciliteze iniţierea infecţiei — pătura de mucus este mai subţire şi mai lentă, bacteriile comensuale sînt absente etc. —, totuşi infecţia gripală evoluează rareori în celulele de la acest nivel. Tropismul ciliar explică localizarea limitată a infecţiei gripale în tractul respirator superior.

Mutante de virus gripal, sensibile la temperatură, produse *in vitro*, au fost testate la voluntari ca tulpini vaccinante potenţiale. Tulpinile care se replică la 32—34°C — temperatura tractului respirator superior —, dar nu la 37°C, pot imuniza fără complicaţii pneumonice. Se pare că un defect al polimerazei virale la temperatură mai ridicată determină incapacitatea mutantelor de a se replica în plămîni şi, de aici, pierderea virulenţei.

În culturi de organ de origine umană, mucoasa nazală adultă sau cea fetală produc de 10 ori mai mult virus decît plămînul fetal. Alte organe fetale — creier, splină, ficat, timus, amnios — nu sînt susceptibile la virusul gripal, deşi ele îl absorb tot atît de bine ca ţesuturile susceptibile (Hara şi colab., 1974). De asemenea, în cazul replicării în plămîni, virusul gripal este eliberat în cantitate mai mică din celulele infectate. Probabil, un inhibitor al neuraminidazei produs local este răspunzător de eliberarea deficitară.

Relativ la inhibitorii nespecifici ai virusului gripal, cei de tip beta neutralizează infectivitatea (inhibitorii mucoproteici alfa şi gamma afectează activitatea hemaglutinantă). La om, rezistenţa tulpinilor asiatice la inhibitorii beta a determinat capacitatea acestora de a infecta şi tractul respirator inferior.

În concluzie, virusul gripal poate afecta diferite segmente ale tractului respirator însă afinitatea preferenţială pentru epiteliul ciliat şi factori nespecifici determină limitarea infecţiei la segmentul extrapulmonar. Intervenţia mecanismelor imune în limitarea infecţiei gripale nu este esenţială, pentru că boala, necomplicată, se vindecă rapid. Fenomenele imune locale (anticorpii secretori, mai ales) intervin în reinfecţii. Imunosupresia postgripală este un fenomen real, adeseori ignorat. La fel, persistenţa virală a fost recent incriminată în stabilirea rezervorului uman de virus între perioadele epidemice.

Trei bariere sînt incriminate în împiedicarea diseminării extrapulmonare a virusului gripal : bariera dintre tractul respirator şi sistemul circulator, bariera dintre sînge şi alte organe extrarespiratorii susceptibile şi, în sînge, bariera constituită de activitatea celulelor sistemului reticuloendotelial. Funcţionalitatea primei bariere explică cantitatea mică de virus care scapă din tractul respirator în sînge iar inhibitorii nespecifici din ser și celulele reticuloendoteliale fac rareori viremia demonstrabilă. Efectele generale ale infecției gripale (mialgia, migrena, greața, febra etc.) sînt atribuite acțiunii toxice a unor produse (celulare sau virale) rezultate în urma replicării virale în tractul respirator. Pirogenii leucocitari, eliberați în urma fagocitării virusului gripal, au fost puși în evidență atît la om, cît și în infecțiile experimentale. De notat că mecanismul distrucției celulare în gripă este urmarea tot a unui efect toxic pe celule. De altfel sînt afectate în egală măsură atît celulele ciliate, care sînt susceptibile la infecție, cît și polimorfonuclearele, macrofagele, limfocitele B și T, care nu sînt susceptibile.

Este cunoscută promovarea infecției bacteriene prin infecția gripală. Stafilococi, pneumococi, mycoplasme și, în mai mică măsură, *Hemophilus influenzae* sînt cei mai des întîlniți patogeni secundari. Mecanismele responsabile de aceste complicații sînt : inhibiția activității mucociliare, scăderea chemotactismului fagocitelor, împiedicarea aglomerării macrofagelor la nivelul focarelor inflamatoare etc. Totodată au fost incriminate și acțiuni specifice imun-mediate, ca aderența stafilococilor purtători de proteină A la celulele infectate și sensibilizate de anticorpi.

7.6.2. GASTROENTERITELE VIRALE (GV)

Sub această etichetă sînt descrise cel puțin două entități clinice distincte : gastroenterita virală epidemică și gastroenterita infantilă sporadică. Agentul etiologic în primul caz este virusul Norwalk, de 27 nm, clasificat între calicivirusuri. Formele clinice sporadice, dar grave la copii, sînt determinate de rotavirusuri. Cîteva aspecte patogenice explică diferențele clinico-epidemiologice sintetizate în tabelul 7-VII.

TABELUL 7-VII

Caracteristici clinico-epidemiologice ale gastroenteritelor virale

Caracteristica	GV cu agenți Norwalk	GV cu rotavirusuri
Epidemiologie	epidemică	sporadică
Evoluție clinică	benignă	severă
Incidență	toate vîrstele	copii sub 2 ani
Contagiozitate	ridicată	joasă
Rezistență după boală	nu conferă protecție	conferă protecție

GV cu agenți de tip Norwalk durează 1—2 zile, nu necesită spitalizare iar semnele generale sînt minore. Anatomopatologic se constată lărgirea și teșirea vililor mucoasei jejunale. Contaminarea este intrafamilială sau de la o sursă comună : mîncare, apă potabilă, apa bazinelor de înot. Datele serologice nu permit corelarea prezenței anticorpilor specifici în ser sau în sucul intestinal cu rezistența la boală. Deși titrul anticorpilor crește semnificativ după boală, reexpunerea la virus se poate însoți din nou de manifestări clinice. Ca şi în gripă, procesele patogenice sînt limitate de evoluţia infecţiei numai la nivelul porţii de intrare.

GV cu rotavirusuri sînt responsabile de 30—40% din afecţiunile diareice care necesită spitalizare la copii. Rotavirusurile afectează frecvent crescătoriile de viţei, porci, miei etc., unde determină episoade diareice severe. Tulpinile animale au antigene fixatoare de complement comune cu cele umane. De asemenea, în imunofluorescenţă se produc reacţii încrucişate. Mecanismul imunologic pare răspunzător, la om, de rezistenţa dobîndită prin boală. Atît anticorpii serici, cît şi cei intestinali sînt eficienţi. Un fapt deosebit îl constituie frecvenţa mare a infecţiilor subclinice care survin la sugarii din secţiile de puericultură. Aceste infecţii induc rezistenţă pentru o perioadă de cel puţin trei ani la expunerile ulterioare la virus.

Leziunile anatomopatologice în diareile cu rotavirusuri afectează întreaga mucoasă intestinală şi constau în scurtarea şi îngroşarea vililor intestinali. Examinarea electronooptică a biopsiilor duodenale relevă prezenţa particulelor virale în cisternele dilatate ale reticulului endoplasmatic din celulele epiteliale ale mucoasei. Replicarea virală în intestin este urmată, probabil, de viremie. Mai multe argumente indirecte pot fi citate. Kapikian şi colab. (1983), studiind un vaccin rotaviral viu atenuat, au constatat la voluntari creşterea neaşteptat de mare a transaminazelor serice. Cu un alt vaccin viu, derivat de la o gazdă heteroloagă (rotavirusuri bovine), s-a indus rezistenţa la boală după administrare orală la om.

Administrarea antigenului rotaviral gravidelor, în scopul stimulării prezenţei anticorpilor specifici în lapte, este un mijloc eficient de protecţie pasivă a copiilor în faţa posibilelor infecţii. Administrarea anticorpilor în lapte s-a făcut şi în scop terapeutic.

7.6.3. HEPATITA B

Caracteristic virusului hepatitei B este spectrul îngust, atît în ceea ce priveşte specia infectată, cît şi tropismul tisular, exclusiv hepatic. Tropismul limitat la hepatocit este contradictoriu în raport cu varietatea sindroamelor clinice, ceea ce a sugerat intervenţia unor variate mecanisme patogenice. Hepatitele B acută şi cronică sînt marcate de necroza hepatocelulară şi inflamaţia însoţitoare. Hepatita B persistentă este asociată de multe ori cu o histologie hepatică normală iar alte leziuni par a fi consecinţa unor mecanisme imunopatologice. S-a discutat mult despre lipsa de patogenitate a HBV. În sprijinul acestei afirmaţii pledează liniile de hepatom care sînt parazitate de HBV şi excretă AgHBs, dar care nu sînt afectate funcţional sau în creştere. De asemenea, purtători sănătoşi, AgHBs pozitivi, nu au, în cele mai multe cazuri, leziuni hepatice. Totuşi nu este exclus ca replicarea întregului genom HBV şi expresia celorlalte antigene (HBc, HBe) să se însoţească de leziuni citopatice. Un alt mecanism pentru explicarea patogenităţii HBV ţine seamă de coinfecţia simultană cu agentul delta. Deseori, la purtătorii de AgHBs, exacerbările se însoţesc de apariţia markerilor pentru agentul delta.

În hepatita persistentă, dar și în hepatitele acută și cronică cu HBV, necroza celulară pare să fie condiționată și de mecanisme imune. Sînt cunoscute cazurile de infecții benigne cu HBV la imunosupresați. În plus, există o corelație semnificativă între vîrsta la care survine infecția și severitatea hepatitei. Concret, infecția cu HBV este inițial benignă la nou-născuți și sugari.

Dintre mecanismele efectoare ale răspunsului imun, rolul celor umorale în injuriile hepatice este exclus, deoarece s-au raportat cazuri severe de hepatită acută sau cronică la bolnavi cu agammaglobulinemie. Rolul mecanismelor celulare a fost însă amplu confirmat. Sensibilizarea celulară survine atît în raport cu antigenele virale, cît și cu cele celulare modificate de infecție. Cum anumiți markeri virali sînt mai frecvent prezenți în hepatita cronică (AgHBs, AgHBe, ADN polimeraza), este posibil ca ei să fie implicați în sensibilizare.

O altă afecțiune asociată infecției cu HBV este *carcinomul hepatocelular* (CH). Incidența CH este de 300 de ori mai mare la indivizii AgHBs pozitivi decît la negativi. Studiile serologice au indicat persistența markerilor infecției HBV la mamele pacienților cu CH, ceea ce sugerează un mod particular de transmitere a infecției — de la mamă la făt. Infecția cu HBV la vîrstă mică conduce frecvent la persistență virală iar, după o incubație apreciată la 35—40 de ani, la CH (asociat în 60—90% din cazuri cu ciroză preexistentă). Analizele secvențiale ale ADN din celulele carcinomatoase indică integrarea unor segmente largi din genomul viral. Integrarea se însoțește de deleții ample și rearanjări și pare a fi situată în locuri preferențiale ale genomului celulei-gazdă. În afara formelor integrate, s-au descris și forme epizomale, cu lungimi apropiate de cele ale genomului viral integru (3 200 de baze). Secvențele virale integrate sînt extensiv metilate, proces asociat cu fenomenele de diferențiere. Metilarea pare să contribuie la reglarea expresiei genelor virale în hepatoame. Semnalăm că transformarea malignă a fost probată și în cazul unor hepadnavirusuri de la animale.

Mecanismul concret al oncogenezei nu este lămurit, însă anumite asemănări cu retrovirusurile sugerează ideea unei patogenii similare. Aceste asemănări privesc strategia replicării genomului viral, deși natura lor este diferită (ARN la retrovirusuri, ADN la hepadnavirusuri). Astfel, în ambele cazuri s-au descris secvențe terminale (300 de perechi de baze) care mijlocesc integrarea (secvențe repetate lungi); replicarea se face printr-un ARN intermediar, transcrierea ARNm se face de pe aceeași spiră ADN și în același sens. În plus, integrarea în genomul celular reține organizarea genomului viral, are loc în situsuri specifice și este urmată numai de expresia anumitor gene.

Rămîne de precizat dacă integrarea — în situsuri adiacente unor oncogene — este suficientă pentru transformarea malignă sau mai este necesară și participarea altor factori (genetici, carcinogeni diverși etc.).

Frecvența manifestărilor extrahepatice în infecția cu HBV, care sugerează o patogenie mediată de complexe imune, prilejuiește și o detaliere a acestui mecanism patogenic frecvent și în alte viroze. Există trei căi de formare a complexelor imune:

— răspunsul imun al gazdei la infecție sau imunizare;

— efectul mitogen nespecific al unor virusuri care stimulează răspunsul policlonal al limfocitelor B (și/sau al limfocitelor T *helper*) ;

— „simularea“ antigenică determinată de epitopi comuni între virusuri și țesuturile gazdei, de unde frecvența autoanticorpilor în viroze (antinucleari, antiactină, antimiozină etc.).

Odată formate, complexele imune sînt depozitate în organele care au un flux mare sanguin și care conțin capilare cu endoteliu fenestrat : glomerulii renali, plexul coroid, splina și ganglionii limfatici. O altă cale, mai fiziologică, de îndepărtare a complexelor imune circulante constă în legarea lor (și, consecutiv, metabolizarea) de celulele care au receptori Fc și C_3 : macrofage, limfocite B, polimorfonucleare. Depășirea posibilităților fiziologice de prelucrare a complexelor imune determină depozitarea lor și patologia consecutivă : glomerulonefrite, vasculite (substratul anatomopatologic al artritelor, mialgiilor, rașului — întîlnite și în infecția cu HBV) etc. Frecvența determinărilor clinice mediate de depozitarea complexelor imune este condiționată de gene virale și ale gazdei. De exemplu, în hepatita B cronică apar frecvent autoanticorpi, ca urmare a stimulării antigenice de durată. Titrul anticorpilor antirujeolici din hepatita cronică poate atinge nivelul din panencefalita sclerozantă subacută, ca urmare a stimulării sintezei anticorpilor virali heterologi. Pe de altă parte, deși majoritatea bolnavilor cu hepatită persistentă au complexe imune circulante, nu toți le depozitează. Depozitarea implică și alte verigi, cum ar fi : funcționalitatea sistemului reticuloendotelial, participarea complementului etc.

Trebuie precizat că, pe lîngă leziunile renale induse de virusuri prin depozitarea complexelor imune, există și alte căi de afectare renală în viroze : efectul toxic direct sau mediat de enzime activate de infecția virală (*a*), autoanticorpii elaborați prin simulare antigenică (*b*) și, paradoxal, producția de interferon (*c*). Gresser și colab. (1978) au arătat că anticorpii antiinterferon pot inhiba dezvoltarea glomerulonefritei. Autorul sugerează rolul inhibitor al interferonului asupra multiplicării celulelor glomerulare care se divid rapid.

7.6.4. FEBRE HEMORAGICE

Discutarea mecanismului patogenic al acestor boli exotice se justifică prin cîteva aspecte care permit generalizări importante.

În primul rînd este vorba despre fenomenul de exaltare a infectivității virale printr-un mecanism mediat de anticorpi (Hawkes și Lafferty, 1967). Explicația constă în faptul că etapele inițiale ale adsorbției virale pot fi mediate, pe lîngă receptorii celulari pentru virus, și de receptorii pentru componente ale sistemului imun, care funcționează ca accesorii ai receptorilor virali. Cu alte cuvinte, într-o primă etapă are loc atașarea la celulele-gazdă a complexelor imune virus anticorpi antivirali și apoi se produc evenimentele replicative. Două clase de receptori imuni au fost implicate : receptorii pentru fragmentul Fc al moleculei de imunoglobulină și receptorii pentru componente din cascada complementului. Ambele clase de receptori sînt heterogene și variabil exprimate la nivelul membranei celulare. Mai important este faptul că unele infecții virale (herpetice) au capacitatea de a induce astfel de receptori.

Conceptul intervenției receptorilor Fc în fenomenul de exaltare a infectivității virale a fost formulat de Halstead (1981) în contextul bolii Denga hemoragice și al sindromului de șoc din boala Denga.

Virusul Denga se replică *in vivo* exclusiv în fagocitele mononucleare. *In vitro*, cantități limitate de anticorpi specifici anti-Denga acționează crescînd vizibil adsorbția virusului la monocite (care au receptori Fc) și, de asemenea, crescînd titrul viral produs în culturi de monocite umane. Copiii născuți în regiuni cu endemie de febră Denga din Sud-Estul Asiei sînt, inițial, protejați de titrul ridicat al anticorpilor materni. Pe măsură ce copilul progresează în vîrstă scade titrul anticorpilor materni și se creează condițiile infecției virale în prezența unor urme de anticorpi. Aceste urme de anticorpi materni sau anticorpii achiziționați în urma unor infecții anterioare cu alte serotipuri de virus Denga (anticorpi heterologi) transformă o febră Denga simplă într-o boală gravă, caracterizată prin șoc hemoragic. În ceea ce privește receptorii pentru complement, este surprinzător să notăm fenomenul de exaltare a infectivității mediată de ei, întrucît, în mod obișnuit, complementul potențează neutralizarea infectivității de către anticorpi. Argumente experimentale au fost obținute, din nou, cu flavivirusuri și bunyavirusuri. Manifestările clinice din febrele hemoragice sînt comune, independent de agentul etiologic (tableul 7-VIII), și anume : febră, mialgii, prostrație și implicare multisistemică datorită leziunilor endoteliului vascular. Leziunile endoteliale, semnalate de peteșii, sînt responsabile de sindromul de coagulare intravasculară diseminată. Direct sau indirect, în patogenie mai participă modificările în sinteza unor mediatori ca : prostaglandinele, leucotrienele, complementul, care, toate, afectează permeabilitatea vasculară. Trebuie subliniat că, deși endoteliul este lezat de toți agenții febrelor hemoragice, celula care susține replicarea virală atît *in vivo* cît și *in vitro* este macrofagul. Macrofagul este și sursa principală de complement, factori ai coagulării și alți mediatori imuni cu moleculă mică.

TABELUL 7-VIII

Elemente clinice ce sugerează diagnosticul febrelor virale hemoragice

Familia virală	Boala	Rezervor biologic	Semne clinice	Patogenie
Flaviviridae	Febra galbenă Boala Denga Febra de Omsk	țînțari țînțari căpușe	hepatită permeabilizare vasculară encefalită	necroză hepatică exaltarea infectivității prin anticorpi
Bunyaviridae	Febra de Congo Febra de Crimeea	căpușe	hemoragii peteșiale	coagulare intravasculară diseminată
Arenaviridae	Febra Lassa	rozătoare	surditate, pericardită, peteșii	viremie
Nedeterminate*	Febre hemoragice cu sindrom renal	rozătoare	nefrită-nefroză	imunopatică

* În acest grup se încadrează și nefropatia endemică balcanică.

În încheiere, atragem atenția asupra unui aspect de biologie generală, particular acestor virusuri. Omul este numai o gazdă accidentală în ecologia virusurilor care determină febre hemoragice. Probabil că numai febra galbenă și Denga se abat de la acest postulat, pentru că flavivirusurile transmise de țînțarii *Aedes* au nevoie de o gazdă amplificatoare (omul). În rest, toți agenții menționați în tabelul 7-VIII se pot transmite vertical, de la o generație la alta a gazdei-rezervor (artropod). Infecția omului reprezintă numai o extensie a spectrului de gazdă, cu consecințe serioase pentru gazda aberantă. Transmiterea verticală se face transovarian la insecte. Fenomene genetice asigură specificitatea transmiterii transovariene și, probabil, unele avantaje selective. Există linii de insecte în care toți progenii sînt infectați. Rămîn să fie precizate mecanismele care controlează infecția noncitolitică a replicării virale la insecte și cursul citolitic la vertebrate. Pentru arenavirusuri care nu utilizează insectele, ci rozătoarele, ca rezervor de virus, menținerea ciclului biologic se face prin infecție persistentă productivă aparent noncitocidă. Totuși, afectarea celulelor parazitate există, dar se rezumă la ceea ce s-au numit funcții înalt specializate ale celulelor *(luxury functions)*, de unde modificările de comportament și neurologice. Tot infecția persistentă a rozătoarelor a fost incriminată în transmiterea nefropatiei endemice balcanice, boală în care etiologia virală nu a fost însă precizată.

7.7. CONCEPTE ACTUALE PRIVIND IMPLICAȚIILE ETIOLOGIEI VIRALE ÎN UNELE BOLI UMANE CRONICE

În virusologia clasică, problemei : un virus — mai multe manifestări clinice îi corespundea și aspectul revers, tot atît de interesant, al determinismului plurietiologic al unei singure boli. Sînt cunoscute exemplele unor afecțiuni respiratorii acute sau digestive acute, clinic nediferențiabile, dar etiologic extrem de diferite. În prezent, studiul unor boli cronice larg răspîndite, ca diabetul, ateroscleroza, cardiomiopatiile, bolile demielinizante, a implicat, direct sau indirect, etiologia virală. Argumente aduse de studiile clinice și experimentale vor fi rezumate în continuare.

7.7.1. DIABETUL VIRAL-INDUS

Asocierea temporală între epidemiile de oreion și incidența mai mare a diabetului insulino-dependent, recunoscută încă din secolul trecut, a dus la formularea ipotezei privind determinismul viral al unor cazuri de diabet juvenil.

Ereditatea diabetului noninsulino-dependent este manifestă ca o trăsătură dominantă autozomală, nelegată de genele HLA. În diabetul insulino-dependent ereditatea este, de asemenea, implicată, de această dată însă în strînsă relație cu fenotipul HLA. Or, fenotipul HLA intervine determinant în susceptibilitatea la infecții. Argumente circumstanțiale au sugerat că unele infecții virale — oreionul, rubeola congenitală, infecțiile cu virusurile Coxsackie B4 — precipită diabetul clinic la persoanele predispuse. Debutul acut al diabetului juvenil, incidența pe grupe de vîrstă (bimodală, corespunzînd intrării în școala primară și secundară), variațiile sezoniere în frecvența cazurilor noi sînt caracteristici compatibile cu o etiologie infecțioasă.

Principalul virus diabetogen relevat de studiile serologice a fost serotipul B4 de virus Coxsackie (în mai mică măsură serotipurile B5, B1 și B2). Nu toți autorii au confirmat aceste rezultate, ci au adăugat noi virusuri candidate, între care virusul rubeolic și herpesvirusurile (citomegalic și Epstein-Barr). Nu mai puțin sugestive sînt datele serologice privind incidența autoanticorpilor direcționați împotriva celulelor beta ale insulelor Langerhans în unele viroze. Acești autoanticorpi sînt prezenți la 70% din cazurile de rubeolă congenitală, la 46% din foștii bolnavi de oreion, la 50% din cei cu mononucleoză infecțioasă. Autoanticorpii lipsesc în cazurile de rubeolă transmise orizontal, în infecțiile cu virusurile Coxsackie, ECHO, gripale și rujeolic (Jenson și Rosenberg, 1980). În fine, sînt citate și cazuri clinice sugestive :

— o fetiță de 5 ani face miocardită și diabet la cîteva săptămîni după o intervenție pe inimă deschisă. În pancreas s-a evidențiat prin imunofluorescență antigenul Coxsackie B4 iar în ser, titruri înalte de anticorpi antivirali ;

— un băiat de 10 ani care decedează la 10 zile de la debutul diabetului prezintă leziuni pancreatice din care se izolează o tulpină de virus Coxsackie B4, diabetogenă la șoarece ;

— un băiat de 14 luni, cu sindrom de rubeolă congenitală, decedează la 5 zile după debutul diabetului. Pe fondul unei insulite subacute, celulele beta lipseau indicînd leziuni citolitice. Recent, Rubinstein și colab. (1982), într-un studiu referitor la 150 de copii cu rubeolă congenitală, găsesc teste anormale de hiperglicemie provocată sau diabet clinic manifest la 20% din bolnavi.

Determinismul viral al diabetului juvenil presupune tropismul unor virusuri pentru celulele beta ale insulelor Langerhans. Jenson și colab. (1980) au examinat leziunile pancreatice la 250 de copii decedați în urma unor viroze incriminînd 14 virusuri. Mai frecvent, necroza insulară a fost notată în infecțiile cu virusul Coxsackie B4 și citomegalic.

Studiile *in vitro* au relevat importanța istoricului pasajelor anterioare pentru tropismul viral. Yoon și colab. (1981) notează că pasajele seriate ale reovirusului de tip 3, în culturi de celule insulare umane, cresc procentajul celulelor beta infectate, de la 6 la 26%. La șoarece, o tulpină nediabetogenă de Coxsackie B4 își modifică tropismul, astfel încît, după 14 pasaje *in vitro* pe celule insulare, produce teste anormale de hiperglicemie provocată la 80% din animalele inoculate.

În concluzie, studiile la om și experimentele pe modele animale indică rolul diabetogen al unor virusuri. Atît leziunile insulare citolitice, cît și cele mediate de autoanticorpi intervin în patogenie. Rolul gazdei nu trebuie subestimat, întrucît argumentele experimentale indică și posibilitatea unei predispoziții genetice, determinată de imposibilitatea compensării celulelor beta excluse în urma infecțiilor virale.

7.7.2. BOLI DEMIELINIZANTE VIRAL-INDUSE

Varietatea afecţiunilor demielinizante umane în care etiologia virală a fost cert argumentată cuprinde un spectru larg de afecţiuni acute (encefalomielitele postinfecţioase sau postvaccinale) şi cronice (scleroza în plăci parkinsonul postencefalitic etc.). Mecanismele patogenice nu sînt identice şi nici specifice. Există patru alternative patogenice, dar acţiunea lor intricată nu este exclusă.

Demielinizarea — consecinţă directă a lizei oligodendrocitelor. Lezarea oligodendrocitelor (care asigură sinteza tecii de mielină) a fost clar demonstrată în leucoencefalopatia progresivă multifocală determinată de infecţia persistentă cu papovavirusuri. Anatomopatologic, au fost găsite plaje întinse de demielinizare fără vreo relaţie cu leziuni vasculare şi, uneori, fără infiltrate inflamatoare asociate. În schimb, oligodendrocitele adiacente aveau nucleii lărgiţi şi se colorau cu anticorpi antivirali marcaţi. În stadiile avansate, şi astrocitele conţin antigen viral. S-a sugerat că virusul responsabil de aceste leziuni este un comensual obişnuit, reactivat însă de stările de imunosupresie. Un model animal ilustrativ al acestui mod de demielinizare este encefalomielita şoarecelui infectat cu un coronavirus — virusul hepatitei murine. Pentru acest model sînt caracteristice remielinizările (şi vindecările clinice) care survin în urma îndepărtării de către macrofage a oligodendrocitelor infectate viral. Animalele vindecate rămîn însă infectate persistent şi unele recurenţe pot apărea tardiv.

Demielinizarea prin citoliza imună a oligodendrocitelor parazitate viral. Panencefalita sclerozantă subacută este o afecţiune demielinizantă, provocată de infecţia persistentă cu virus rujeolic. Virusul parazitează atît neuronii, cît şi oligodendrocitele. Paradoxal, boala evoluează în ciuda unor titruri excesive de anticorpi antivirali prezenţi în ser şi LCR. Leziunile demielinizante sînt însoţite de infiltrate perivasculare de limfocite şi plasmocite, ceea ce argumentează patogenia lor imună. Liza celulelor infectate depinde de realizarea unui anumit raport între titrul anticorpilor, al complementului şi nivelul expresiei antigenului viral la suprafaţa celulelor.

Demielinizarea autoimună. Cunoscutul model experimental al encefalomielitei alergice experimentale (EAE) reproduce o histopatologie identică cu encefalomielitele postinfecţioase sau postvaccinale care complică convalescenţa rujeolei, oreionului sau vaccinarea rabică (mai ales consecutiv imunizării cu vaccinuri preparate pe ţesut nervos). Explicarea patogenică admisă constă în modificarea antigenicităţii mielinei şi promovarea unor leziuni prin autoanticorpi. O altă teorie susţine că sensibilizarea la mielină este datorată unor secvenţe antigenice virale care mimează epitopii proteinei bazice a mielinei. Panitch şi colab. (1979) au arătat că există o reactivitate încrucişată între anticorpii antimielinici şi cei antirujeolici. Mai menţionăm posibilitatea ca unele infecţii virale neurotrope să precipite reactivări ale unor simptome encefalomielitice. De exemplu, infecţa latentă cu virus herpetic face animalele mult mai susceptibile la inducţia EAE.

Demielinizarea secundară nespecifică. În multe infecţii neurotrope sau facultativ neurotrope, celulele inflamatoare participante în focarele lezionale pot elibera substanţe care produc demielinizare nespecifică. Probabil că acest mecanism este responsabil numai de demielinizări limitate spaţial şi că mult mai important este efectul limfokinelor eliberate în focarele inflamatoare, care aglomerează celulele imunologic-competente în raport cu mielina. Mobilizarea limfocitelor sensibilizate sau a celulelor producătoare de anticorpi antimielinici explică frecvenţa demielinizărilor în infecţii cu virusuri complet diferite ca : paramyxovirusuri, rhabdovirusuri, arbovirusuri etc.

7.7.3. IMUNOSUPRESIA DE ETIOLOGIE VIRALĂ

Studiul infecţiilor virale cronice a demonstrat în unele cazuri (hepatită B, herpes, coriomeningită limfocitară) că virusurile pot altera funcţionalitatea unor celule în absenţa modificărilor patologice. Alterare funcţională nu este fără semnificaţie clinică, mai ales cînd vizează celulele aparţinînd unor sisteme critice în economia organismului, cum sînt celulele sistemului imun. Efectul imunosupresor al unor infecţii virale a fost notat de clasici ai medicinii interne. Osler, la mijlocul secolului al XVIII-lea, semnala reactivarea infecţiei tuberculoase bronşice sau sistemice consecutiv rujeolei. În 1908, von Pirquet a arătat că reactivitatea la tuberculină este pierdută în cursul rujeolei acute şi se restabileşte în convalescenţă. Aceste observaţii au fost amplu confirmate cu tehnici imunologice moderne şi extinse şi la alte infecţii virale : rubeolă, oreion, gripă, varicelă. Deşi nu există o opinie unitară asupra mecanismelor imunosupresiei virale, efectul a fost constatat în cercetări utilizînd diferite protocoale experimentale : studiul răspunsurilor primar sau secundar în anticorpi, răspunsul la mitogeni nespecifici, citotoxicitatea imun-mediată, producţia de limfokine, teste de hipersensibilitate cutanată întîrziată. De exemplu, secreţia de imunoglobuline de către limfocitele umane infectate cu o varietate de virusuri este semnificativ afectată, deşi viabilitatea şi rata de diviziune a limfocitelor sînt nemodificate. Pelton şi colab. (1980) au arătat că răspunsul specific în imunoglobuline este diminuat în cursul infecţiei herpetice. Imunosupresia este datorată afectării preferenţiale a celulelor T *helper*. Diminuarea sintezei de anticorpi în alte viroze este datorată intervenţiei altor mecanisme. Unul din modelele cele mai folosite pentru evidenţierea efectului unor imunomodulatori (chimici, bacterieni, biologici) este tocmai refacerea capacităţii de răspuns imun alterată de infecţia virală. În acest caz, activitatea celulelor ajutătoare ale răspunsului imun este vizată.

Imunosupresia severă din sindromul de imunodeficienţă dobîndită (SIDA) este datorată compromiterii funcţionalităţii limfocitelor T *helper*, parazitate de virus. Este interesant de menţionat că rolul citolitic al HIV nu este evident decît în momentul stimulării mitogene a limfocitelor parazitate latent de HIV prin infecţii supraadăugate cu alte virusuri sau cu alte serotipuri HIV.

Semnificaţia clinică a imunosupresiei viral-induse este încă subapreciată. Numeroase agravări ale unor maladii cronice pot fi explicate de imunosupresia indusă de viroze intercurente beningne. De asemenea, evoluția postoperatorie a unor bolnavi poate fi complicată de viroze care augmentează imunosupresia deja indusă de șocul operator. Nu trebuie exclusă nici posibilitatea stării reverse, de imunostimulare, în viroze. Există perspectiva ca modularea răspunsului imun prin preparate bacteriene să fie concurată de utilizarea unor virusuri în același scop.

Bibliografie selectivă

BANG F. B. — Adv. Virus Res., 1978, 23, 269.
BOCCARA M., KELLY F. — Virology, 1978, 90, 147.
BRINTON M. A., NATHANSON N. — Epidemiol. Rev., 1981, 3, 115.
BRINTON M. A., FERNANDEZ A. V. — Virology, 1983, 129, 107.
CERNESCU C. — Rev. Roum. Méd., Virol., 1982, 33, 189.
CERNESCU C., STRATI I., POPESCU L., PETRESCU V. — Rev. Roum. Méd., Virol., 1986, 37, 89.
DIMMOCK N. J. — J. Gen. Virol., 1982, 59, 1.
ELDER H. J. — În Concepts in Viral Pathogenesis, Notkins A. L. și Oldstone M. B. A. (red.), p. 86, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1984.
ENEGREN B. J., BURNESS A. T. — Nature, 1977, 268, 536.
FAZEKAS de St., GROTH S. — Nature, 1948, 162, 294.
FENNER F., RATCLIFFE F. N. — Myxomatosis, Cambridge University Press, New York, 1965.
FIELDS B. N. — În Concepts in viral pathogenesis, Notkins A. L. și Oldstone M. B. A. (red.), p. 102, Springer Veralg, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1984.
GALLO R. C., WONG-STHAL F. — Blood, 1982, 60, 545.
GALLO R. C., SARIN P. S., GELMANN E. P. — Science, 1983, 220, 865.
GLASER R., DE THE G., LENOIR G., HO J. H. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1976, 73, 960.
GREEN M. T., COURTNEY R. J., DUNKEL E. — Infect. Immun., 1981, 34, 987.
GREENBERG H. B., KALICA A. R., WYATT R. G. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78, 420.
GRESSER I., MOREL-MAROGER L., VEIROUS P. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, 75, 3 413.
GROSS L. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1951, 76, 27.
HALSTEAD S. B. — Am. J. Epidemiol., 1981, 114, 632.
HARA K., BEARE A. S., TYRELL D. A. J. — Arch. gesammte Virusforsch., 1974, 44, 227.
HAWKES R. A., LAFFERTY K. J. — Virology, 1967, 33, 250.
HELENIUS A., MOREIN B., FRIES E. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, 75, 3 846.
HOLMES I. H., RODGER S. M., SCHNAGL R. D. — Lancet, 1976, i, 1 387.
JENSON A. B., ROSENBERG H. S., NOTKINS A. L. — Lancet, 1980, ii, 354.
KAPIKIAN A. Z., WYATT R. G., GREENBERG H. B. — Dev. Biol., 1983, 53, 209.
KAWASHIMA K. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1976, 73, 4 680.
KEW O. M., NOTTAY B. K., HATCH M. H. — J. Gen. Virol., 1981, 56, 337.
KHELIFA R., MENEZES J. — J. Virol., 1983, 46, 325.
KRISTENSSON K. — Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1978, 18, 97.
LENTZ T. L. — Science, 1982, 215, 182.
LUNG M. L. HARTLEY J. W., ROWE W. P., HOPKINS N. H. — J. Virol., 1983, 45, 275.
MANDEL B. — Virology, 1967, 31, 238 și 248.
MOORE N. F., PATZER E. J., SHAW J. M. — J. Virol., 1978, 27, 320.
MORISHIMA T., McCLINTOCK P. R., AULAKH G. S. — J. Gen. Virol., 1983, 64, 34.
NOTKINS A. L. — Virology, 1982, 122, 461.

OLDSTONE M. B. A. — În Concepts in Viral Pathogenesis, Notkins A. L. și Oldstone M. B. A. (red.), p. 269, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1984.

PALESE P., KINKSBURG D. W. — Genetics of Influenza Viruses, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1983.

PANITCH H. S., SWOVELAND P., JOHNSON K. P. — Neurology, 1979, 29, 548.

PELTON B. K., DUNCAN I. B., DENMAN A. M. — Nature, 1980, 284, 176.

PHILIPSON LY., EVERITT E., LONBERG-HOLM K. — În Cell Membrane Receptors for Viruses, Beer R. F. și Bassett E. G. (red.), p. 203, Raven Press, N. Y., 1976,

POIESZ B. J., COURTNEY R. J. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, 77, 7 415.

POPOVIC M. — Science, 1983, 219, 856.

POSTE G., NICHOLSON G. L. — Virus Infections and the Cell Surface, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1977.

PRABHAKAR B. S., HOSPEL M. W., McCLINTOCK P. R. — Nature, 1982, 300, 374.

RUBINSTEIN P., WALKER M. E., FEDEEN B .— Diabetes, 1982, 31, 1 088.

SHIBUTA H., ADACHI A., KANDA T. — Infect. Immun., 1982, 35, 437.

SZMUNESS W. — Prog. Med., Virol., 1978, 24, 40.

TABOR E., PONZETTO A., GERIN J. L., GERETY R. J. — Lancet, 1983, i, 765.

WALDMAN R. H., GANGULY R. — Ann. N.Y. Acad. Sci., 1977, 284, 153.

WELLS A., KOIDE N., STEIN H., GERDES J., KLEIN G. — J. Gen. Virol., 1983, 24, 499.

YOON J. W., SELVAGGIO S., ONODERA T. — Diabetologia, 1981, 20, 462.

8

Genetica virusurilor umane

8.1. INTRODUCERE

Dependența totală a existenței virusurilor de pătrunderea în celulele gazdei și de proliferarea virală pe baza materială și energetică endocelulară a făcut ca dinamica biologiei virale să fie privită, pe bună dreptate, în contextul biologiei celulare. Totuși, indiferent de origine și ciclul lor de viață, virusurile s-au dovedit a fi entități ale materiei vii, cu structuri și funcții caracteristice. Considerate ca individualități, virusurile își au astfel fiziologia lor ca reflectare a morfologiei (vezi capitolul 3) și, bineînțeles, genetica lor. Genetica virusurilor este un domeniu al geneticii generale și se ocupă cu studiul eredității, variabilității și determinării caracterelor virale. Comparativ cu celula sau cu organismele pluricelulare, evident mai complexe, virusurile se rezumă la molecule de acid nucleic (fie ADN, fie ARN), ca material genetic, și proteine cu roluri de asamblare, de protecție a respectivului material, de interacțiune invazivă cu celula-gazdă și, uneori, de asigurare a primelor faze din ciclul intracelular (enzimă de replicare a acidului nucleic și/sau proteine de inițiere a replicării). Nici o altă formă de organizare a materiei vii nu exprimă prin structură, mai pregnant decît virusurile, relația directă dintre acizii nucleici și proteine și implicit principiul central al geneticii contemporane (fig. 8-1) de codificare a caracterelor.

Tratarea exhaustivă a subiectului acestui capitol nu este posibilă, nu datorită unui fond documentar limitat, ci datorită implicațiilor întinse ale geneticii virale. Luria (1962), unul din întemeietorii geneticii moderne, afirmă că „toată cercetarea virusurilor este o ramură a geneticii“. Respectiva aserțiune, neagreată în acel timp pentru virusurile organismelor pluricelulare (Fenner și Sambrook, 1964), are un puternic impact în prezent. De exemplu mecanismele infecției, cronicizării, implicațiile în hepatocancerogeneză și în epidemiologie ale virusurilor hepatitice B au fost aprofundate prin cunoașterea structurii genetice a ADN viral specific (Vyas și Blum, 1984); mecanismele pandemiilor de gripă și ale infectivității au dobîndit precizări importante odată cu înțelegerea mai profundă a geneticii virusurilor gripale (Van Rompuy și colab., 1983). Astfel, afirmația lui Luria devine concludentă și potrivită cu modul în care sînt tratate diversele subiecte ale virusologiei medicale din această carte. Atunci, se pune întrebarea, de ce mai trebuie și un capitol de genetică virală ? Necesitatea unui astfel de capitol în contextul virusologiei medicale este motivată de următoarele sublinieri : *1)* folosirea metodelor genetice de mutație, recombinare și selecție pentru studiul efectelor patogene ; *2)* cunoașterea variabilității tulpinilor virale circulante în marile epidemii ; *3)* ameliorarea tulpinilor folosite în producția de vaccinuri ;

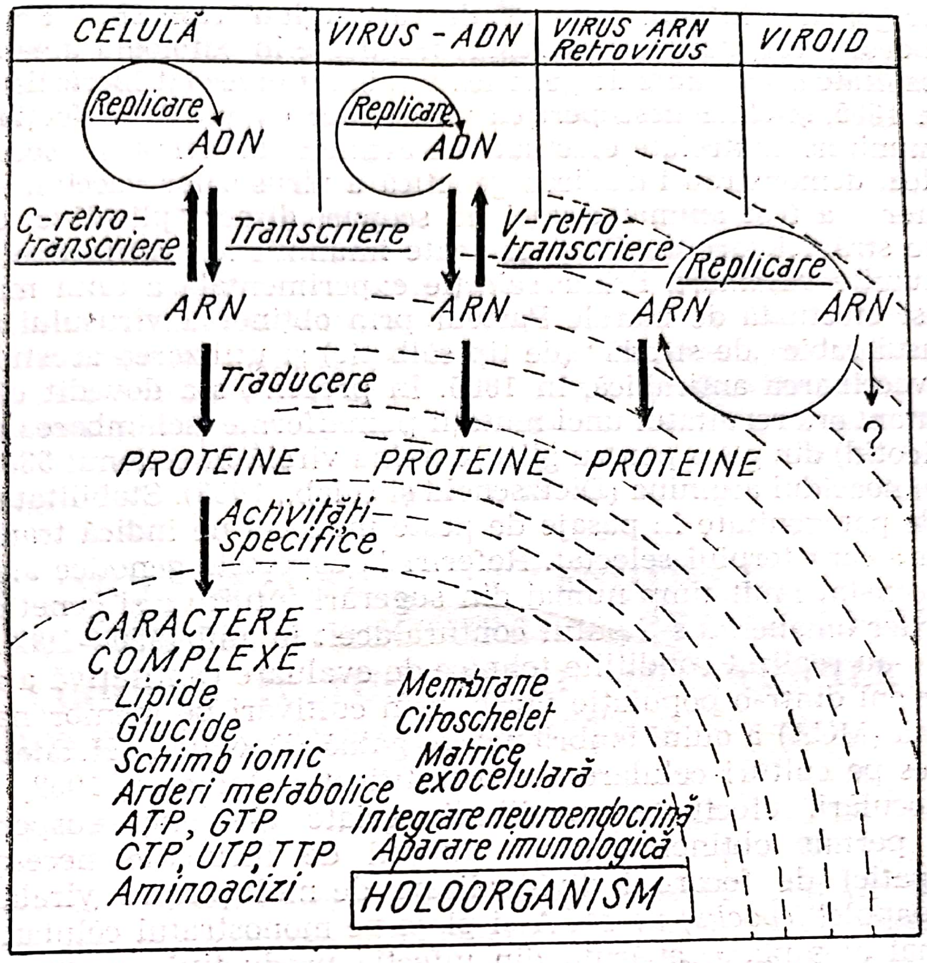

CELULĂ
VIRUS - ADN
VIRUS ARN Retrovirus
VIROID
Replicare
ADN
Replicare
ADN
C-retro-transcriere
Transcriere
V-retro-transcriere
Replicare
ARN
ARN
ARN
ARN
Traducere
?
PROTEINE
PROTEINE
PROTEINE
Activități specifice
CARACTERE COMPLEXE
Lipide
Glucide
Schimb ionic
Arderi metabolice
ATP, GTP
CTP, UTP, TTP
Aminoacizi
Membrane
Citoschelet
Matrice exocelulară
Integrare neuroendocrină
Apărare imunologică
HOLOORGANISM

Fig. 8-1 — Dogma centrală a geneticii moleculare este exprimată cel mai pregnant la virusurile ADN, deoarece se rezumă doar la relația ADN—ARN proteine.
Descoperirea retrotranscrierii la retrovirusuri *(V-retrotranscriere)* a demonstrat că fluxul informațional între acizii nucleici poate fi și invers (ARN—ADN); *C-retrotranscriere* — retrotranscriere celulară descoperită mai recent și care demonstrează că respectiva reacție este generală și, în consecință, se impune a fi notată în schema dogmei centrale; *viroizi* — molecule circulare de ADN care prezintă replicare, descoperite numai la plante și care se transmit prin contiguitate intercelulară (pînă în prezent nu s-au găsit proteine corespunzătoare secvenței lor nucleotidice); *arcurile de cerc* indică faptul că virusurile își derulează ciclul vital pe baza energetică și materială a celulelor infectate.

4) aprofundarea cunoașterii mecanismelor de biologie celulară și moleculară în reglarea transcrierii la metazoare și reglarea diviziunilor celulare; *5)* stabilirea structurilor genetice ale unor virusuri prin metode aparținînd exclusiv geneticii moleculare (de exemplu, cunoașterea structurii ADN al virusurilor hepatitei B); *6)* contribuții importante la stabilirea faptului că acizii nucleici constituie substratul molecular al eredității; *7)* descoperirea retrotranscrierii (transcrierii inverse sau reverstranscrierii), în primul rînd prin studiul geneticii ribovirusurilor oncogene (retrovirusuri), reacție care se dovedește a fi generală (vezi fig. 8-1); *8)* cerința definirii noțiunilor de genetică într-un context adecvat, noțiuni care sînt repetat utilizate în descrierea diferitelor virusuri implicate în patologia umană.

Rezultate importante de genetică virală au precedat lucrările lui Mendel, din 1865, și chiar descoperirea virusurilor ca entități infecțioase. Primele imunizări controlate efectuate de Jenner, la sfîrșitul secolului al XVIII-lea, demonstrau înrudirea genetică a virusurilor vaccinia—variola, deși autorul a fost animat atunci de scopuri direct aplicative, ale căror rezultate strălucitoare au făcut ca toate imunizările profilactice prezente să fie numite *vaccinări*. Prima selecție experimentală a unui mutant viral a fost efectuată de marele Pasteur prin obținerea virusului rabic fix din virusul rabic „de stradă" (de tip sălbatic) și utilizarea acestui mutant pentru vaccinarea antirabică, în 1885. În prezent, s-a dovedit că respectivul mutant era rezultatul unei mutații punctiforme (schimbarea unui singur nucleotid) din gena pentru glicoproteina virală în codonul 333 care codifică aminoacidul arginina (Dietzschold și colab., 1983). Stabilitatea schimbărilor de patogenitate în pasaje de peste un secol ne indică transmiterea ereditară a caracterului selectat. Referiri la aspectele genetice ale virusurilor au constat mult timp numai din sugerări intuitive și genetica virală a virusurilor umane nu s-a putut contura decît în anii 1950—1960. În acea perioadă s-au realizat condițiile tehnice de evaluare cantitativă a numărului de virioni dintr-o populație virală prin cultivări pe membrana corioalantoidiană (MCA) a oului embrionat de găină (Downie și Haddock, 1952) și mai ales pe culturi celulare monostratificate (Dulbecco, 1952). Respectivele inoculări, efectuate cu diluții seriate ale unei suspensii inițiale, au permis obținerea (după timpul de incubație necesar efectului citopatic) de focare individualizate de multiplicare virală, observate ca „papule" *(pocks)* pe MCA și plaje pe monostratul celular. Fiecare papulă, mai ales plajă, apărută din infecția productivă, conține o populație de virioni derivată de la un singur virion inițial, adică o clonă virală. Tehnica plajelor, inspirată din tehnologia de lucru cu bacteriofagi, a permis îndeplinirea condițiilor mendeliene de investigație genetică : *1*) populații virale cu individualități uniforme ; *2*) purificarea prin selecție de individualități (virioni) purtătoare de trăsături diferite ale aceluiași caracter, adică markeri genetici ; *3*) izolarea populațiilor pentru investigații, prin înlăturarea amestecurilor aleatorii ; *4*) testarea efectelor de împerechere în condiții controlate. Recoltarea individuală a plajelor și multiplicarea prin pasaje crescătoare au dat posibilitatea de a obține eșantioane de clone virale în cantități destul de mari, pentru analize genetice de tip clasic și analize de genetică moleculară (Fenner și Sambrook, 1964). În același timp sau chiar precedînd analizele genetice, s-au obținut rezultate de importanță generală prin studii moleculare ale activității biologice privind acizii nucleici virali. Astfel, Gierer și Schramm (1956) demonstrează infectivitatea ARN purificat al virusului mozaicului tutunului (TMV). Respectivul ARN, inoculat pe frunze excoriate, a fost captat de celule și a generat infecție productivă cu formarea de virioni maturi de TMV. Fenomenul denumit ulterior transfecție (descrisă pe larg mai departe), constituia încă o demonstrațe neechivocă a rolului de material genetic exercitat de ARN în cazul particular al virusurilor. Molecule de ARN purificat de la picornavirusuri (virusul encefalitic Mengo) au fost curînd dovedite a fi infective (Colter, 1957). Urmează apoi o perioadă de analize genetice și moleculare, extinsă pînă în prezent, ale căror rezultate şi interpretări constituie obiectul capitolului de faţă.

Este de menţionat că dotarea tehnică mult mai pretenţioasă necesară substratelor celulare de cultivare a virusurilor animale, de la materialele elementare — ca puritatea apei distilate — pînă la complexitatea mediilor de cultură (vezi capitolul 5), a determinat ca investigaţiile genetice şi moleculare ale respectivelor virusuri să fie posibile mai tîrziu decît cele întreprinse în domeniul bacteriofagilor. Gazdele acestora, bacteriile, cultivate în condiţii incomparabil mai simple, manipularea mult mai facilă a sistemelor fag — bacterie au constituit condiţii care pentru savanţi eminenţi ca Luria şi Delbrück (1943), Hershey şi Chase (1951) au fost propice iniţierii metodologiei genetice în studiul virusurilor. Este indubitabil că descoperirile rezultate din genetica bacteriofagilor (Luria, 1962) au precedat şi inspirat metodologia genetică utilizată în studiul virusurilor umane (Fenner şi White, 1976).

8.2. GENOMUL, GENOTIPUL ŞI FENOTIPUL VIRUSURILOR. STRUCTURALIZAREA GENOMULUI ÎN VIRIONUL MATUR. STĂRI STRUCTURALE DOBÎNDITE ÎN CICLUL INFECŢIOS

8.2.1. GENOMUL VIRAL ŞI GENOTIPUL VIRAL

Se înţelege prin *genom viral* masa de material genetic (ADN sau ARN) care conţine totalitatea genelor producătoare de proteine şi a segmentelor de acid nucleic fără corespondenţă proteinică, dar cu alte funcţii mai mult sau mai puţin precizate.

Prin *genotip viral* se înţelege totalitatea segmentelor de material genetic (gene) dovedite să corespundă la caractere fenotipice manifestate în morfologia virionului matur, cît şi în ciclul biologic al virusului, de infecţie şi multiplicare. Este de resubliniat că virusurile — fie animale, fie umane, fie vegetale sau bacteriene — contrar organismelor celulare cu genom ADN, pot avea genom ADN sau genom ARN. Această caracteristică se află la baza împărţirii în două mari categorii — dezoxiribovirusuri, respectiv ribovirusuri. Dacă la nivelul genomurilor celulare, cu o cantitate mare de ADN/genom, cu molecule de mărime impresionantă, de ordinul $n \times 10^{10}$ daltoni, aprecierile cantitative la nivel molecular sînt în stare născîndă, la nivelul virusurilor genomurile se măsoară fie în unităţi de masă moleculară — daltoni, kilodaltoni sau megadaltoni (Mdalton = un milion de daltoni) —, fie în număr de nucleotide (structură monocatenară) sau perechi nucleotidice. Întrucît bazele purinice şi/sau pirimidinice sînt cele care caracterizează structura nucleotidelor (fig. 8-2), atunci unitatea de măsură devine baza din nucleotid sau perechile de baze. Cum acizii nucleici sînt macromolecule cu mii de baze, în literatură se întîlneşte în mod frecvent ca unitate de măsură kilobaza (kb), care reprezintă o mie de perechi nucleotidice pentru structura bicatenară sau o mie de nucleotide pentru structura monocatenară. În fig. 8-2 este redată o scală de co-

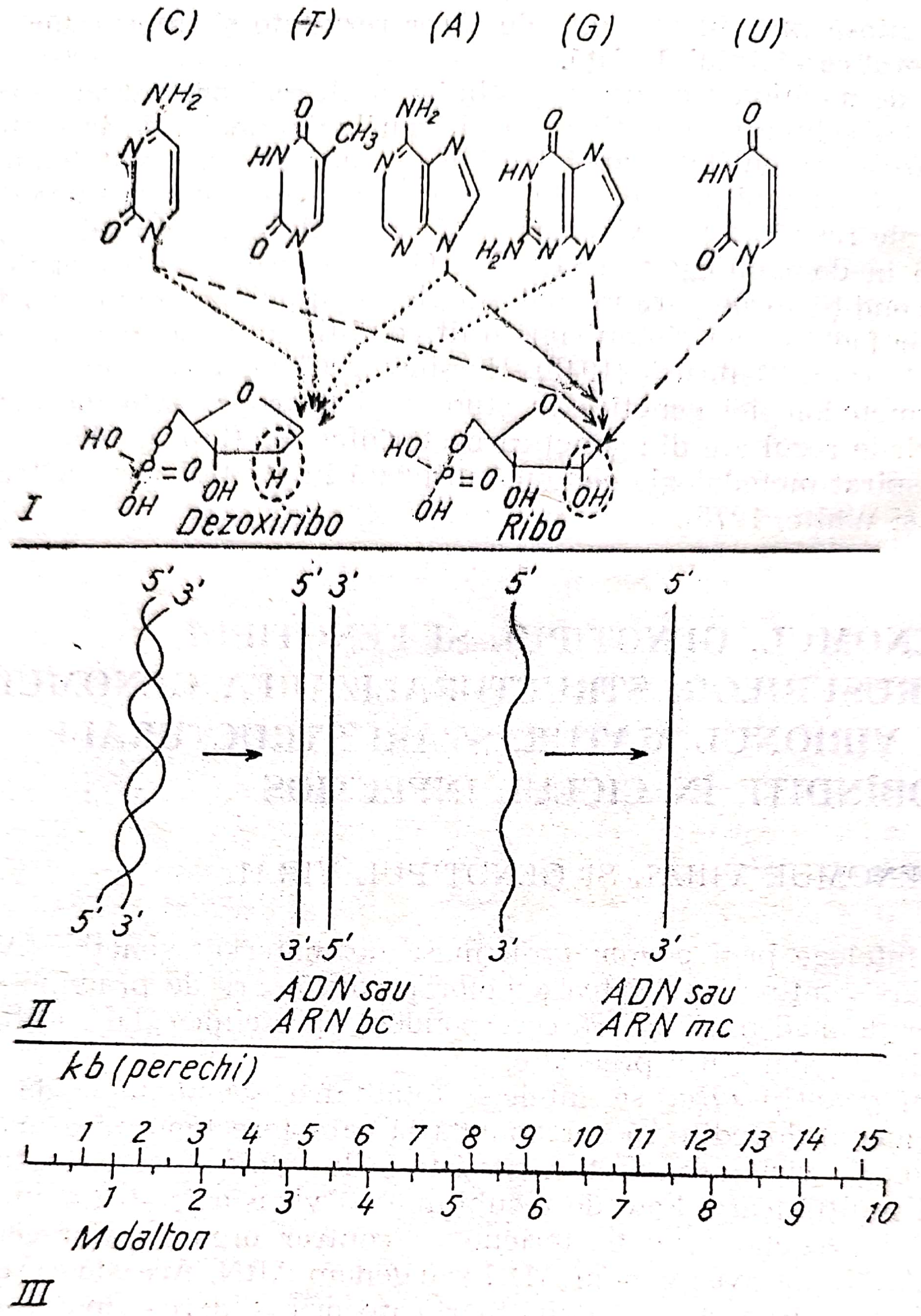

(C)
(T)
(A)
(G)
(U)
NH₂
CH₃
O
HN
N
H₂N
HO
P=O
OH
H
Dezoxiribo
Ribo
I
5'
3'
ADN sau
ARN bc
ADN sau
ARN mc
II
kb (perechi)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
M dalton
III

Fig. 8-2 — Rememorarea structurii nucleotidelor principale. Reprezentarea schematică a moleculelor de ADN.
I — bazele pirimidinice: citozina *(C)*; timina *(T)*; uracilul *(U)*; bazele purinice: adenina *(A)* și guanina *(G)*; ...〉 și ---〉 — modul de legare în dezoxiribonucleotide, respectiv în ribonucleotide; *II* — molecule bicatenare *(bc)* de ADN și de ARN; molecule monocatenare *(mc)* de ADN și ARN; *III* — scala de raportare kb/Mdalton (după Old și Primrose, 1980).

respondență între kb și Mdalton (Old și Primrose, 1980). Folosirea structurii, mărimii, numărului de molecule și felului de acid nucleic drept criterii esențiale de clasificare face de prisos rementionarea lor (vezi capitolul 2). Așa cum se ilustrează în fig. 8-3, genomurile virale prezintă o heterogenitate impresionantă, nemaiîntîlnită la alte grupări taxonomice. Ca

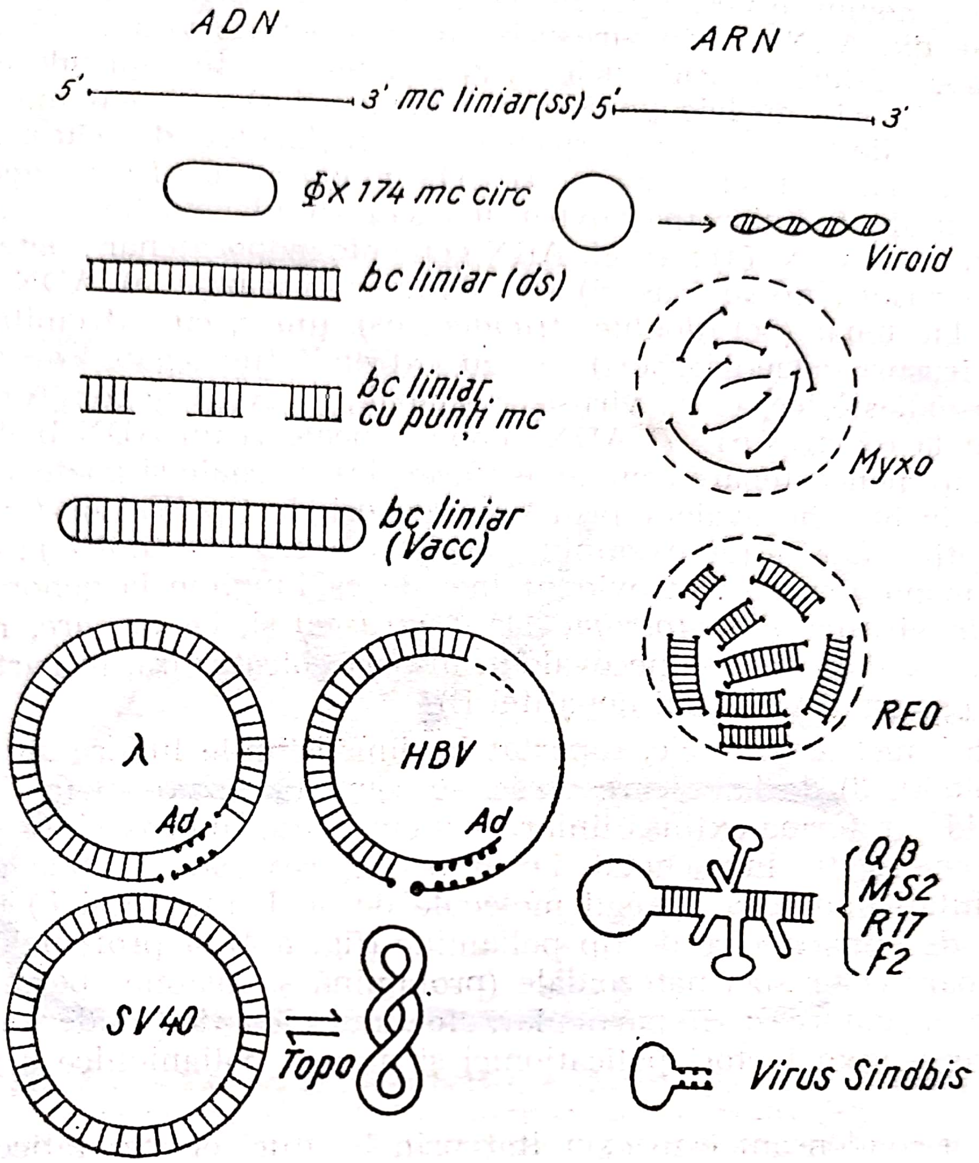

ADN
ARN
5'
3' mc liniar(ss) 5'
3'
ΦX 174 mc circ
Viroid
bc liniar (ds)
bc liniar cu punți mc
Myxo
bc liniar (Vacc)
REO
λ
Ad
HBV
Ad
Qβ
MS2
R17
f2
SV40
Topo
Virus Sindbis

Fig. 8-3 — Forme de genom viral ADN și ARN : ADNmc (ss) liniar (parvovirusuri) ; ARNmc liniar (picornavirusuri, virusul hepatitei A) ; ADNmc circular (viroid) supratorsionat (→) datorită complementarităților intramoleculare ; ADNbc (ds) liniar (adenovirusuri, herpesvirusuri) ; ADNbc liniar cu punți monocatenare (fagul T5) ; ADNbc liniar cu extremitățile închise covalent (*Vacc* — genom de virus vaccinal) ; genom cu ADNbc circular închis, necovalent, prin extremități monocatenare adezive *(Ad)* complementare (bacteriofagul λ) sau cu extremități adezive mc-bc (virusurile hepadna — HBV) ; genom de ADNbc circular închis, covalent, în formă extinsă și supratorsionată *(supercoil, supertwist, superhelix)* într-un supraelicoid al structurii bielicoide bazale (vezi și fig. 8-2) [structura extinsă este condiționată de legarea unor proteine de schimbare conformațională — topoizomeraze *(topo)*] ; genom de virus gripal format din 8 molecule liniare inegale de ARN (Myxo) ; genom de reovirus format din 10 molecule liniare (bc) de ARN (REO) ; virusuri cu genom ARNmc intens pliat (conformația florală a moleculei de ARN) (fagii mici : Qβ, R17, MS2, f2) ; secvență terminală complementară repetată în ordine inversă *(inverted terminal repetition)* de tipul abc-a′b′c′ (virus Sindbis).

urmare, genomurile virale pot fi : *1)* formate din ADN (la dezoxiribovirusuri) sau din ARN la (ribovirusuri) ; nu s-a descris vreun virus care să aibă ambele feluri de acid nucleic ; *2)* genomul poate cuprinde o singură moleculă de acid nucleic (majoritatea virusurilor) sau mai multe molecule (virusurile gripale și reovirusurile) ; *3)* moleculele de acid nucleic pot fi monocatenare sau bicatenare ; *4)* ADN monocatenar (mc) *single stranded*, ss) poate fi liniar (parvovirusuri) sau circular închis, covalent (de exemplu fagul φ X174) ; la fel, ARN genomic monocatenar poate fi liniar (picornavirusuri, myxovirusuri) sau circular (viroizi) ; *5)* ADN genomic poate fi bicatenar (bc) (*double stranded*, ds), liniar, cu extremități libere (herpesvirusuri, adenovirusuri) sau cu extremitățile legate covalent prin punți fosfodiesterice, ca la virusul vaccinal ; *6)* ARN genomic este și el bicatenar la reovirusuri ; 7) ADN genomic poate fi un ADN bielicoid, cu extremități monocatenare complementare adezive egale și poate avea stare circulară închisă necovalent prin împerecheri de tip Watson-Crick între extremitățile adezive (de exemplu, genomul bacteriofagului λ) ; *8)* extremitățile monocatenare sînt evident inegale ca lungime la genomul ADN de hepadnavirusuri (*hepatotropic DNA viruses*) și, ca urmare, rezultă o structură circulară închisă necovalent, în parte bicatenară, în parte monocatenară (genomul virusului hepatitei B).

Acidul nucleic genomic, raportat la dimensiunile liniare ale capsidei (vezi capitolul 3) de la oricare virus, se constată că nu poate fi cuprins intracapsidic în forma extinsă liniară sau circulară. În consecință, genomul viral trebuie să fie împachetat, iar împachetarea este posibilă datorită : *a)* flexibilității ample a întregii molecule de acid nucleic și *b)* prezenței factorilor de împachetare de tip poliamine (fig. 8-4) și proteinelor bazice asemănătoare celor spermatozoidale (protamină și histone spermice). Împachetarea se datorează, în particular, efectului picnotic (condensant) exercitat de respectivii factori policationici și naturii polianionice a genomurilor.

Efectul condensant este exercitat prin legături electrostatice (ionice) stabilite între grupările cationice ale poliaminelor oligocationice și ale proteinelor policationice, pe de o parte, și diferite regiuni polianionice întinse ale acidului nucleic, pe de altă parte. Capacitatea condensantă a policationilor proteinici, relevată de Antohi și colab. (1982, 1984) pe structuri polianionice întinse, prezintă grade diferite de picnoză și interferențe de condensare cu poliaminele, fapt care explică de ce oligocationii poliaminici influențează replicarea genomurilor virale (Raina și colab., 1981). Poliaminele au potențialul de a relaxa picnozele policationice date de proteinele bazice (Antohi și colab., 1984), pregătind încă din faza de virion matur desfășurările catenare pentru replicarea endocelulară. De fapt, numeroase virusuri (virusurile gripale, hepadnavirusurile) mai au intracapsidic, alături de genom, și molecule de polimerază de replicare ca stare premonitorie necesară replicării genomice intracelulare din faza timpurie a invaziei.

La mai multe virusuri animale (myxovirusuri, herpesvirusuri, poxvirusuri) s-au pus în evidență cantități semnificative de spermină și spermidină (Bachrach și colab., 1974 ; Gibson și Roizman, 1971 ; Lanzer, 1975 ;

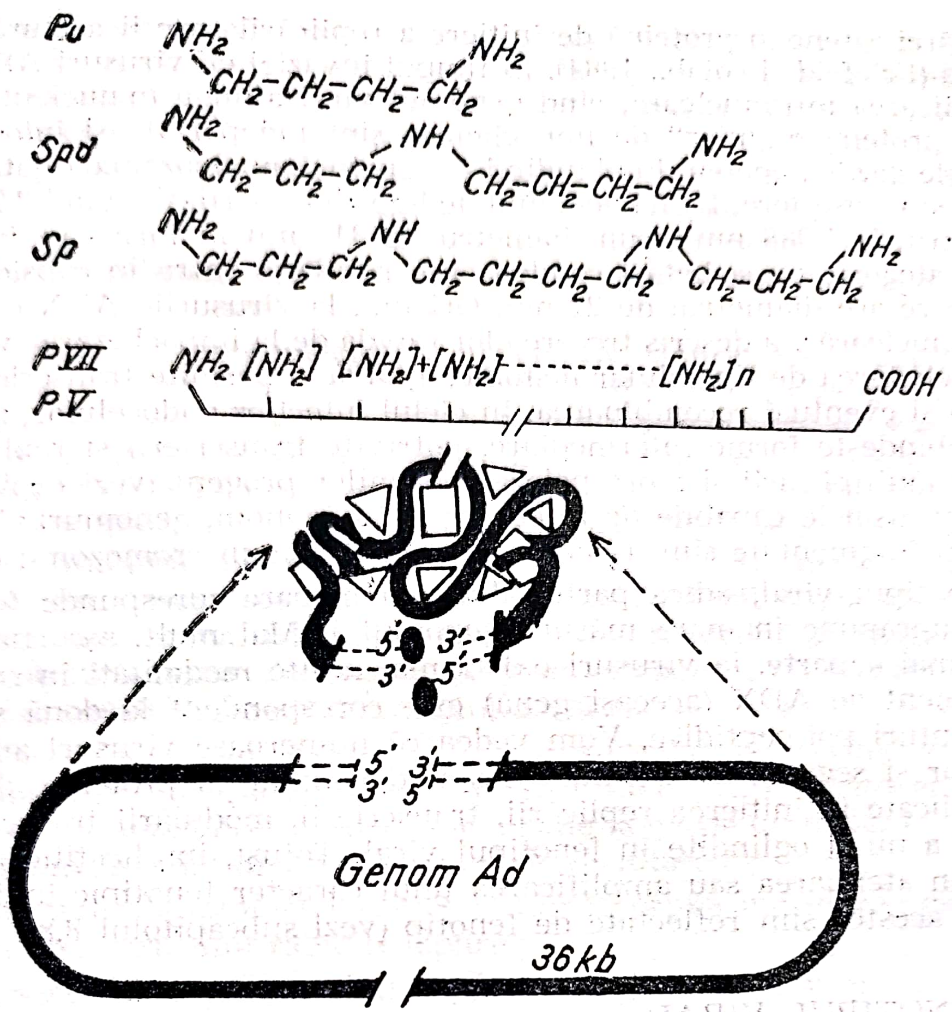


Fig. 8-4 — Factori ai împachetării genomului în virionul matur și un model de împachetare la adenovirusuri (Ad).
Pu — putresceina (1,4-diaminobutan) precursor ; *Spd* — spermidina (3-aminopropil-1,4-diaminobutan) ; *Sp* — spermina (bis-3-aminopropil-1,4-diaminobutan) ; *PVII* și *PV* — proteine bazice policationice posesoare de mai mult decît 4 grupe amino : △ și □ — proteine bazice care supratorsionează condensat (picnotic) (- - - ⟩) genomul monomolecular bicatenar liniar de ADN de 36 kb dînd posibilitatea să fie încapsidat în virionul matur de 90 mm în diametru ; ● — proteină terminală inițiatoare legată la extremitățile 5′ de la capetele genomice (supratorsionarea intravirionică, deși nu are aspect nucleosomic nuclear, are o periodicitate asemănătoare, deoarece prezintă ghemuri ordonate cuprinzînd segmente de ADN de 0,15 kb/ghem).

Raina și colab., 1981). La majoritatea virusurilor s-au observat proteine specializate picnozei asociate genomului, cu capacitatea de a realiza un „ghem“ ordonat ca „miez“ virionic *(virus core)*, denumit și nucleoproteină virală. De exemplu, grupul pox prezintă o organizare genomică de împachetare genomică a moleculei liniare de ADN bicatenar prin două proteine-„miez“ : tipul VII de 18 kilodaltoni, 1 080 de molecule/genom și tipul V de 45 kilodaltoni, 180 de molecule/genom (Sung și colab., 1983). Mai mult, la fiecare extremitate genomul are legată covalent la capătul 5′

al fiecărei catene o proteină de inițiere a replicării care îi asigură și stabilitate (Friefeld și colab., 1984). În timpul invaziei cu virusuri ADN, care au replicarea intranucleară, cînd genomul viral ajunge în nucleul celulei-gazdă, proteinele-„miez" de împachetare sînt îndepărtate și înlocuite cu histonele gazdei, genomul dobîndind o structură nucleozomală gata de replicare și transcriere. La fel genomul de hepadna — HBV (avînd 3,2 kb, un perimetru de 1 088 nm și un diametru de 346 nm în forma extinsă) necesită categoric împachetări condensante pentru a intra în capsida neînvelită care are diametrul de 22 nm. Oricum, la virusurile ADN cu multiplicare nucleară s-a descris trecerea lor rapidă de la împachetarea virionică la împachetarea de tip celular histonic, aptă de a permite transcrierea, replicarea și eventual recombinarea. În ciclul infecțios endocelular, genomul viral dobîndește forme intermediare, potrivite transcrierii și replicării în vederea multiplicării și morfopoiezei virionilor progeni (vezi capitolul 6). Pentru virusurile capabile de integrare în citogenom, genomuri virale întregi sau fragmentate sînt asociate covalent liniar în cromozomii celulari.

Genotipul viral, adică partea din genom care corespunde fenotipului, se suprapune în mare măsură genomului. Mai mult, așa cum se va descrie mai departe, la virusuri există mai multe modalități în care același segment de ADN (aceeași genă) este corespondent la două sau mai multe lanțuri polipeptidice. Vom vedea că numeroase virusuri au în genomul lor și segmente care nu corespund coliniar la proteine, dar care sînt implicate în inițierea replicării, transcrierii, modulării transcrierii și care par a nu fi oglindite în fenotipul viral. Totuși, implicațiile lor cantitative în atenuarea sau amplificarea unui caracter fenotipic indică faptul că și acestea sînt reflectate de fenotip (vezi subcapitolul 8.8).

8.2.2. FENOTIPUL VIRAL

Asemănător cu definirea fenotipului organismelor pe care le infectează, prin fenotipul virusurilor se înțelege totalitatea caracterelor observabile ale unui virus dat (cf. gr. *phainein*=ceea ce se vede+*typos*=tip, categorie de ansamblu caracterologic). Cum toate caracterele unui virus sînt ereditare (se transmit în succesiunea de generații virale), înseamnă că fiecare caracter observabil își are un corespondent genomic, o genă sau o regiune genetică ; acestea constituie genotipul particularizat al caracterului în cauză. De exemplu, antigenul de suprafață al virusului hepatitei B își are gena *s* corespunzătoare, deci are genotipul particular antigenului. Cu alte cuvinte, toate manifestările fenotipice au corespondențe genotipice și această aserțiune este ilustrată de dictonul preclasic „fenotipul este oglinda genotipului", dicton cu caracter axiomatic și în prezent.

Deoarece virusurile nu pot fi văzute nici cu microscopul optic, atunci observarea fenotipului viral în studiile de genetică s-a limitat de-a lungul timpului și se limitează și în prezent la mijloacele tehnice de punere în evidență a caracterelor virale la un moment dat. Cu cît tehnicile sînt mai avansate, cu atît șirul de caractere fenotipice crește și se aprofundează, iar fenotipul viral devine mai complex. În continuare vom reda o înșiruire de caractere fenotipice care reproduc *largo sensu* istoria investigațiilor genetice asupra virusurilor :

1. *Studiul genetic al caracterelor de patogenitate și spectrul de gazde.* Capacitatea unui virus de a produce boala la organismul infectat în condiții naturale sau experimentale (inoculare de produs infecțios la voluntari, care în general au fost cercetătorii înșiși, sau la animale de laborator) constituie caracterul de patogenitate de bază. Din acesta derivă apoi virulența (potențialul și viteza de invazie), formele de infecție (acută, lentă și latentă), spectrul de gazde, poarta de intrare (respiratorie, nazală, faringiană, traheobronșică, alveolară, enterică, genitală), infecția abortivă și cea subclinică.

Din caracterele de patogenitate au derivat și primele caractere studiate genetic, și anume spectrul de gazde și dependența de gazdă. Prin spectrul de gazde (cf. engl, *host range,* hr) se înțelege șirul de specii susceptibile de a avea simptome clinice și/sau manifestări histopatologice ca urmare a infectării cu un virus dat. Caracterul de dependență de gazdă (cf. engl. *host dependence,* hd) constă în capacitatea unui virus de a se replica pe o anumită gazdă cu caractere modificate, care permit multiplicarea virusului. Caracterele de patogenitate au dobîndit o mai mare exactitate și au devenit mai nete prin cultivarea virusurilor pe culturi celulare monostratificate și observarea plajelor citopatice, cît și prin dependența de temperatură (vezi subcapitolul 8.8 și capitolul 11).

Studiul caracterelor patogene a fost stimulat de cerința esențială pentru stabilirea diagnosticului și pentru investigarea patogenezei, și anume aceea a „adaptării“ virusurilor umane la gazde animale. Inocularea la gazda animală a dat mai multe tipuri de rezultate :

a) obținerea simptomelor caracteristice la prima inoculare ; de exemplu, inocularea virusului rabic la iepure ;

b) observarea semnelor clinice și/sau histopatologice minime la prima inoculare și, după pasaje seriate pe același animal, a simptomelor nete și a letalității ; astfel, de exemplu, s-a efectuat „adaptarea“ virusului poliomielitic la rozătoare. O consecință a replicării virusului o constituie apariția în celulele infectate a *incluziilor virale,* care nu sînt altceva decît formațiuni intracelulare ce reprezintă locul în care s-au sintetizat componentele virale sau în care s-au asamblat virionii. Incluziile prezintă colorabilitate variată, sînt acidofile sau bazofile, intranucleare sau intracitoplasmatice ;

c) constatarea că prima inoculare este asimptomatică, pentru ca apoi, prin pasaje seriate „oarbe“, să se obțină un virus cu capacități patogene evidente : un bun exemplu este „adaptarea“ virusurilor gripale umane pe șoarece prin pasaje oarbe (Cajal, 1959).

Exemple de spectre de gazde sînt descrise în diverse capitole de virusologie specială la secțiunile de „boală experimentală“. Pasajale pe animal au dus la obținerea de tulpini virale atenuate, nepatogene pentru om, dar imunogene, rezultat practic considerabil pentru profilaxia prin vaccinări.

2. *Studiul caracterelor virale amplificate macroscopic și observate in vitro.* Cele mai importante sînt : urmărirea *in vitro* a degenerării și distrugerii celulare ca urmare a multiplicării citopatogene (efect citopatic) ; observarea lipsei multiplicării unui virus inoculat pe o cultură deja infectată cu alt virus (fenomenul de interferență) ; reacțiile serologice (hema-

glutinarea, hemadsorbția, reacția de seroneutralizare și reacția de fixare a complementului) și alte studii prin care se pun în evidență proprietăți antigenice și antigene individualizate, cît și determinanți antigenici (epitopi) prin tehnologia anticorpilor monoclonali.

3. *Studiul caracterelor morfologice prin microscopie electronică.* Microscopia electronică a adus o adevărată revoluție în cunoașterea biologiei virusurilor și în investigațiile de genetică. Caracterizarea purității suspensiilor virale și a mutațiilor structurale necesită examene electronooptice. Examenele de microscopie electronică moleculară au permis observarea de structuri heteroduplex intermediare în reacțiile de recombinare.

4. *Izolarea și purificarea virionilor, dezasamblarea lor in vitro și studiul spectrelor electroforetice ale proteinelor virionice și/sau polipeptidelor,* ajungîndu-se astfel la nivelul molecular al fenotipului viral (fig. 8-5).

5. *Observarea electroforetică, cromatografică, imunofluorescentă a proteinelor produse de genomul viral în ciclul endocelular de multiplicare.* Respectivele proteine necesare transcrierilor și replicării nu intră în structura virionului matur, motiv pentru care sînt numite nestructurale.

Caracterele moleculare, exprimate în lanțuri polipeptidice de diferite tipuri, reflectă gene din genomul viral și reprezintă o „disecție" biochi-

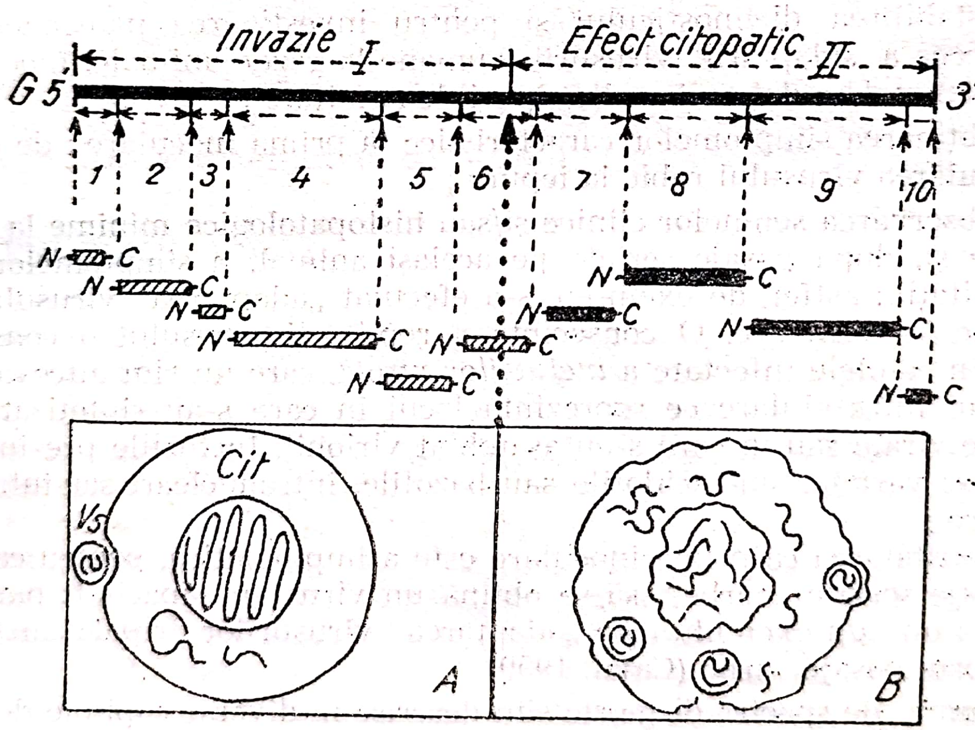


Fig. 8-5 — Relații moleculare între caracterele clasice de patogenitate și mijloacele moderne de cunoaștere a proteinelor diverse, reflectarea lor în structura genomică.

G — genom viral; *I, II* — regiuni genetice clasic considerate gene; *1—10* — proteine evidențiate electroforetic în omogenate acelulare ale celulelor cu infecție abortivă și infecție productivă; - - -› — proiecția lor genomică în interiorul celor două „gene" clasice devenite regiuni genetice prin studiul molecular al fenotipului viral; *A* și *B* — infecție abortivă, respectiv infecție productivă cu efect citopatic indicînd două gene clasice ale șirului de gazde, nepermisive, respectiv permisive.

mică a factorilor implicați în caracterele de patogenitate și imunogenitate (vezi fig. 8-5). Este de menționat că studiul molecular al fenotipului viral nu a înlăturat și celelalte studii privind caracterele fenotipice majore de patogenitate și imunogenice (antigenice). Frecvent, determinările moleculare ale schimbărilor de fenotip sînt precedate de evaluarea caracterelor patogene și de antigenitate iar variantele mutaționale testate molecular sînt controlate pentru patogenitate, antigenitate și pentru caracterele morfologice (Doerfler, 1984) ; Fujinaga și colab , 1984).

8.3. ACIDUL NUCLEIC INFECȚIOS. TRANSFECȚIA

Descoperirea lui Gierer și Schramm (1956) a capacității infective a ARN viral purificat nu a constituit numai argumentul hotărîtor că și ARN poate fi deținătorul informației genetice, ci a furnizat și o metodă generală de studiu a geneticii virusurilor, denumită mai tîrziu transfecție (Trautner și Spatz, 1973). Prin *transfecție* (transformare infecțioasă) se înțelege reproducerea de virioni maturi prin intermediul acidului nucleic viral purificat, captat și internalizat în celulele-gazdă specifice. Cu alte cuvinte, acidul nucleic respectiv este capabil singur, fără celelalte componente ale virionului, să determine propria sa replicare, sinteza tuturor factorilor proteinici nestructurali și structurali ceruți ciclului infecțios endocelular și morfopoiezei virale. Acidul nucleic viral singur are, în consecință, proprietatea ca, odată pătruns în celula-gazdă, să inducă infecție productivă cu eliberare de virioni întregi, să fie deci infecțios. Transfecția, descoperită la virusurile ARN, s-a dovedit apoi a fi manifestată și de ADN al bacteriofagilor (Mandel și Higa, 1970) și al virusurilor ADN de la animale (Knipe, 1982 ; Levine, 1982 ; Doerfler, 1982). Este de menționat că în literatura recentă termenul de transfecție nu este folosit de toți autorii ; frecvent este utilizat pentru a desemna numai infectivitatea ADN viral (Old și Primrose, 1980) iar pentru ARN viral se păstrează denumirea de ARN infecțios (Lemon, 1985). Mai mult, teremenul de transfecție a fost extins și la transformarea celulară malignă cu fragmente genomice de ADN viral purificat din dezoxiribovirusuri oncogene, transformare care nu implică și formarea de vironi maturi (așa cum este definită transfecția).

ARN viral poate fi infecțios cînd îndeplinește următoarele condiții : *a)* moleculele de ARN să fie genomuri virale întregi și nu fragmente genomice (Gierer, 1960) ; *b)* ARN viral să provină de la virusuri în care genomul virionului matur să reprezinte, în timpul infecției, atît matriță pentru replicarea virusului, cît și ARNm capabil să participe ca matriță, atașată de ribozomi, pentru sinteza de proteine timpurii necesare replicării, adică să fie catenă pozitivă *(positive strand)*; astfel de ARN a fost obținut de la picornavirusurile de tipul virusului poliomielitei sau virusului hepatitei A (Siegl și colab., 1981) ; *c)* virusurile ARN cu catenă negativă și cu genom segmentat (virusurile gripale, reovirusurile) nu pot avea ARN infecțios, deoarece ARN purificat al acestor virusuri este disociat, prin purificare, de polimeraza de acompaniament (Luria și colab., 1978) și nu pot sintetiza catena pozitivă cerută pentru producerea proteinelor virale ; *d*) celulele acceptoare pentru ARN infecțios să permită multiplicarea și infecția productivă în teste preliminare efectuate cu virioni întregi, corespunzători respectivului ARN de încercat pentru infectivitate.

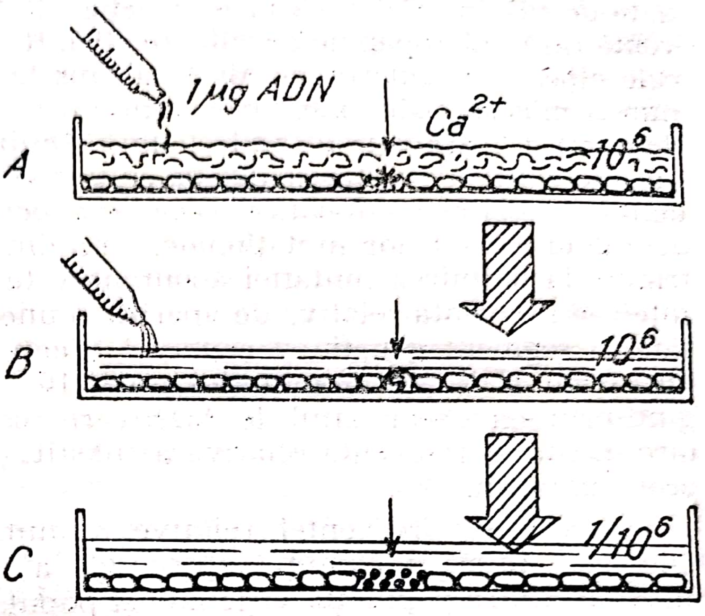
Condițiile de îndeplinit pentru ARN infecțios sînt valabile și pentru transfecția cu ADN viral. În plus, celulelor, pe lîngă aspectul de a fi gazde specifice pentru virusul furnizor de ADN, trebuie să li se inducă o stare optimă de acceptare a ADN viral, mai ales prin tratare cu ioni de calciu și/sau magneziu, metodologii insipirate de la transfecția bacteriilor și formulate de Spizizen și colab. (1966) și de Mandel și Higa (1970). La bacterii, testarea eficienței de transfecție este relativ simplă ; celulele bacteriene competente (făcute apte de acceptare a ADN fagic), incubate cu respectivul ADN, sînt inoculate cantitativ prin dispersie pe plăci cu mediul propice de creștere „în pînză“, iar apoi sînt incubate și citite pentru numărul de plaje de liză. Deoarece evenimentul de transfecție este rar, fiecare plajă se consideră că este dată de bacteriofagii proveniți din transfecția unei singure bacterii. Ca urmare, eficiența se exprimă fie ca număr de celule transfectate raportat la numărul de bacterii viabile, fie ca număr de plaje (celule transfectate) pe 1 µg de ADN fagic. De exemplu, pentru fagii de *Bacillus subtilis*, Contente și Dubnau (1979) dau o eficiență de transfecție de 10^{-4} — 10^{-5} celule din populația transfectată, iar Old și Primrose (1980) raportează că ADN de fag λ are o eficiență de 10^5 plaje/1 µg ADN.

În orice caz, acizii nucleici virali izolați au o infecțiozitate de 1 000 pînă la 10 000 de ori mai mică decît aveau în virionii din care au fost extrași. Acest lucru se explică datorită rapidei degradări la care este supus acidul nucleic de către exonucleazele din membranele celulare și din lichidele extracelulare. Totodată, devine evident rolul capsidei în fixarea și adsorbția virionilor pe celule. Substanțe care favorizează înglobarea virionilor sînt soluțiile saline (ca suport al mecanismului pinocitozei), fosfatul de calciu precipitat care fixează și leagă virionii de celule, precum și complexarea cu policationi (protamina sau DEAE-dextranul).

Pentru acizii nucleici ai vrusurilor animale, evaluarea cantitativă devine tot atît de simplă în condițiile culturilor de celule și a obținerii de plaje citopatice. Oricum, eficiența s-a dovedit mai scăzută decît cea de la bacterii (Doerfler, 1982). Datorită rarității evenimentului de transfecție, virionii recoltați dintr-o plajă sînt sigur proveniți dintr-un singur genom viral, adică dintr-un singur viron (fig. 8-6).

Pînă în prezent nu a fost observată transfecția naturală la virusuri animale sau bacteriene. Totuși, se admite că transmisia epidemică și infecția naturală cu viroizii plantelor au loc prin mecanisme asemănătoare transfecției. Viroidul cartofului cu tuberculi fuziformi constă dintr-o moleculă de ARN de 0,36 kb, monocatenară, circulară (vezi fig. 8-3), fără să mai aibă și vreo altă dotare proteinică (Riesner și colab., 1983). Omologiile segmentare determină ca molecula circulară să dobîndească o stare secundară de „baston“, prin împerecherile Watson-Crick intracatenare. Prin efectul lor citopatic, al cărui mecanism nu este concludent, viroizii sînt eliberați de celulele mortificate prin necroliză și transfectează celulele

Fig. 8-6 — Ilustrarea etapelor de transfecție.
A — acoperirea unui strat monocelular de 10^6 celule cu o soluție netoxică de acid nucleic infecțios, incubație, eliminarea soluției ; ✱ — eveniment de captare și internalizare a moleculei genomice într-o celulă ; B — înlocuirea soluției A cu mediul optim de creștere pentru monostratul celular ; C — apariția unei plaje care conține virioni întregi multiplicați (● ● ●) pornind de la un singur genom viral, deci o clonă de virusuri.



normale. Oricum, descoperirea relativ recentă a unui agent viral asemănător viroizilor la limfoame epidemice de hamster (Coggin și colab., 1981, 1983) sugerează că ar putea exista agenți asemănători viroizilor și la om, cu posibilitatea de a fi implicați în etiologia unor boli umane cu patologie criptogenetică.

Metoda transfecției este de mare utilitate pentru genetica virusurilor, din numeroase motive. Dintre acestea subliniem : *a*) obținerea de clone purificate de virus printr-o metodă precisă, evaluată cantitativ ; *b*) posibilitatea obținerii de mutații induse prin tratarea acidului nucleic purificat cu mutageni ; *c*) transfecția fragmentată poate preciza regiunile genomice ale dezoxiribovirusurilor oncogene implicate în malignizare ; *d*) evaluarea neechivocă a funcției de stocare a informației genetice de către acizii nucleici ; *e*) este o metodă de precizare a calității pozitive sau negative a catenei de ARN care alcătuiește genomul unui ribovirus.

8.4. MUTAȚIA SPONTANĂ, MUTAGENEZA INDUSĂ ȘI MARKERI GENETICI VIRALI UTILIZAȚI PENTRU ANALIZE GENETICE ȘI SCOPURI APLICATIVE

8.4.1. MUTAȚIA SPONTANĂ

Schimbarea naturală a unui caracter viral transmisibilă ereditar în progeniile virale, adică mutația spontană la virusuri, a fost studiată pentru prima dată în mod sistematic ad-hoc la virusurile pox prin caracterul micropapulelor (cf. engl. *pocks*) provocate pe membrana corioalantoidiană a oului embrionat (Downie și Haddock, 1952). Micropapulele roșii date de tulpina sălbatică prin infecția MCA aveau printre ele, cu o frecvență rară, micropapule de culoare albă. Recoltarea virionilor, exclusiv din cele albe, și inocularea pe MCA au dus la selecția unui virus care dădea numai micropapule albe, virus denumit mutantul u, față de tipul sălbatic denumit u^{+}. Aproape în același timp, Dulbecco (1952) pune la punct tehnica de cultivare a virusurilor pe culturi celulare monostratificate, cu evidențierea plajelor citopatice, ceea ce a permis o apreciere cu mai multă acuratețe a valorilor mutaționale. Una din valorile importante care contribuie la definirea mutației spontane este rata de mutație, prin care se înțelege frecvența relativă de apariție a unei schimbări mutaționale raportată la segment genetic și replicări (Fenner, 1976). De exemplu, pentru virusurile ADN rata de mutație este de 10^{-5} — 10^{-6}/ genă/replicare, înțelegînd prin genă segmentul de ADN care codifică o proteină. O altă raportare constă în frecvența relativă a substituției unui aminoacid dat dintr-o proteină pe an.

Raportarea frecvenței relative a mutației spontane la unitatea de timp este utilă în evoluția epidemică a tulpinilor virale. În conflictul infecțios dintre populația virională și populația umană ne interesează măsura în timp cu care varianta epidemică poate să furnizeze mutații cu alte semnificații epidemiologice decît cea observată la un moment dat. Tot pentru virusurile ADN rata mutațională astfel apreciată are valori de 4×10^{-9} — 7×10^{-9}/an/aminoacid. Considerînd că un aminoacid din proteină corespunde unui codon din ADN iar gena are cel puțin 100 de codoni, atunci diferența de trei ordine de mărime între cele două tipuri de evaluare a ratei este explicabilă. Ratele de mutație spontană la dezoxiribovirusuri este apropiată celor observate la genele din genomurile celulelor (organismelor)-gazdă. Ca o paranteză, rata de mutație la virusuri nu se poate raporta la generații și virioni ca la macroorganisme, deoarece numărul de replicări interpuse între genomul inoculat și virusurile progene este considerabil, de ordinul sutelor ; ca urmare, rata se raportează la evenimente de replicare (Fenner, 1976), deoarece o replicare completă a genomului viral este relativ corespondentă unei generații de la organisme.

Pentru unele virusuri ARN rata mutației spontane este cu mult mai mare. De exemplu, pentru glicoproteinele hemaglutininei de virus gripal rata este de $2{,}4 \times 10^{-3}$/an/aminoacid iar pentru nucleoproteină este de $1{,}8 \times 10^{-3}$/an/aminoacid (Van Rompuy și colab., 1983). Explicația moleculară ar consta din faptul că ARN polimerazele dependente de ARN (replicazele) care asigură replicarea genomului viral nu sînt dotate cu capacități de „corectare“ (cf. engl. *proof-reading),* așa cum le au ADN polimerazele de replicare a ADN (pentru detalii, vezi Antohi, 1985). Oricum, labilitatea virusurilor ARN, care ar rezulta din lipsa capacității de corectare a „ARN replicazei“, pare a fi compensată de selecția impusă de gazdă, selecție care elimină în diferite faze ale ciclului de multiplicare o mare parte din vironii purtători de mutații. Virusurile cu șiruri limitate de gazde prezintă în populația naturală a virionilor mutații spontane cu o rată mai scăzută. Așa s-ar explica rata mai scăzută a mutațiilor spontane la virusurile poliomielitic, rujeolic, ale hepatitei A, virusuri ARN care se replică tot prin activitatea unei polimeraze lipsite de capacitatea de corectare. Dovada importanţei gazdei în relevarea mutaţiei spontane o constituie obţinerea, prin metode clasice, de tulpini atenuate de virus prin schimbarea gazdei sau prin schimbarea porţii de intrare (de exemplu, virusul rabic fix — Pasteur, tulpinile atenuate şi vaccinante de virus poliomielitic). Astfel de mutaţii nu ar fi putut fi observate în contextul infecţiilor şi propagării naturale.

În propagarea epidemică naturală ca şi în infecţia experimentală, dinamica populaţiei virionice este de mare importanţă pentru aprecierea conjuncturilor în care mutaţiile spontane se produc. Ca urmare a infecţiei unei gazde, fie organismul uman, fie gazda de laborator (animale, ouă embrionate, culturi de celule), virusurile iniţiale infectante se multiplică de milioane de ori. În fiecare individualitate-gazdă rezultă populaţii de virusuri de ordinul bilioanelor, populaţii care, indubitabil, cuprind şi mutanţi spontani. Semnificaţia lor este condiţionată de mai multe posibilităţi : *a)* mutantul apărut prezintă avantaje selective faţă de restul virusurilor, în sensul că devine mai patogen şi schimbă evident profilul epidemiei ; *b)* momentul, mai timpuriu sau mai tardiv, de producere a mutaţiei în timpul infecţiei (stării de îmbolnăvire) ; dacă apare mai timpuriu are timpul necesar să se multiplice şi să fie semnificativ atît în transmiterea, cît şi în evoluţia stării de boală ; dacă apariţia are loc tardiv, spre sfîrşitul bolii, mutantul are mai puţine probabilităţi să fie relevant, cu excepţia foarte rară în care ar putea eventual provoca o recrudescenţă a îmbolnăvirii ; *c)* mutantul prezintă o atenuare evidentă a patogenităţii ; posibilitatea poate fi relevantă în epidemii cînd, concomitent atenuării, acelaşi mutant prezintă şi schimbări antigenice care-l fac mai puţin sensibil la presorul imun (starea de imunitate a populaţiei-gazdă faţă de virusul neschimbat mutaţional). În situaţia respectivă, mutantul atenuat se multiplică mai puternic decît virusurile genitoare, are un *fitness* selectiv avantajos şi devine observabil ; *d)* atenuarea patogenităţii în infecţia experimentală este mai bine observabilă, deoarece schimbarea gazdei constituie de la început un presor selectiv iar dinamica populaţiei virionice este mai puţin aleatorie prin controlul exercitat de experimentator (alegerea căii de inoculare, cantitatea inoculului, gazda utilizată, alegerea temperaturii de incubaţie în cazul ouălor embrionate şi culturilor celulare, momentul pasajelor, puritatea genetică a virusurilor manipulate şi alte condiţii de protocol experimental).

Cauzele mutaţiilor spontane la virusuri se suprapun cu cele invocate pentru explicarea evenimentelor mutaţionale naturale de la organismele celulare : agenţii fizici şi chimici naturali (radiaţiile naturale, mutageni chimici aflaţi în mediul extern). Referitor la virusuri, nişa lor ecologică (celulele-gazdă) poate constitui un factor de mutageneză naturală, aşa cum se va descrie în subcapitolul 8.6.

Ca o particularitate menţionată mai sus, la ribovirusuri, însuşi mecanismul de replicare, nedotat cu capacităţi de corectare a erorilor de replicare, poate fi considerat ca o cauză importantă pentru apariţia mutaţiilor spontane la respectivele virusuri.

8.4.2. MUTAGENEZA INDUSĂ ȘI AGENȚII MUTAGENI UTILIZAȚI

Se înțelege prin *mutageneză indusă* procedeul de creștere a ratei de mutație spontană pentru un caracter dat, prin tratarea virusurilor cu un agent cu afinități preferențiale pentru genomurile virale. Agentul respectiv, inductor de mutații, se numește *agent mutagen*. Folosirea mutagenezei la virusuri a avut și o perioadă importantă de dezvoltare între anii 1955—1965, cînd s-a stabilit majoritar gama de agenți fizici și chimici valabili pînă în prezent. Pentru inducția de mutații s-au utilizat fie suspensii de virioni maturi, fie acizi nucleici purificați infecțioși, fie stările replicative din timpul ciclului infecțios. Populația de virioni inițială, folosită direct în tratarea cu agent mutagen, provine de la tulpini de virus izolate în diagnosticul de laborator și, în general, clonate. Clonarea se efectuează prin tehnica plajelor ; prin replicarea virusurilor obținute dintr-o plajă citopatică-citolitică se obține o populație virală pură. Populația virală obținută astfel prin clonare, cu caracterele fenotipice inițiale, se numește tulpina de tip sălbatic (Fenner și colab., 1974).

În general, într-o experiență de mutageneză se urmărește relevarea și selectarea mutanților numai pentru un caracter corespunzător unei regiuni genetice și nu mai multe, deoarece, altminteri, experiența degenerează rapid în rezultate încîlcite, dificil, dacă nu imposibil, de analizat. Înaintea experienței de mutageneză se testează efectul inactivant, dependent de doză, exercitat de agentul mutagen. Se utilizează dozele care dau o supraviețuire de cel puțin 10^{-3} virioni/populație utilizată. Pentru suspensii virale s-au utilizat ca agenți mutageni fizici razele X, razele ultraviolete, radiațiile emanate de elemente radioactive. În cazul razelor ultraviolete, suspensia virală trebuie agitată continuu în timpul expunerii, deoarece soluțiile apoase opresc razele UV și dau protecție. Totodată, particulele virale neagitate exercită efect de „umbră" între ele. Numeroși agenți mutageni chimici au fost utilizați în mutageneza virală. Mulți dintre ei au fost inițial studiați la virusuri. De exemplu, efectul mutagen al acidului nitros a fost descris inițial la virusul mozaicului tutunului de către Schuster și Schramm (1958) iar mutageneza cu hidroxilamină — la bacteriofagi (Freese, 1961).

În privința raportului dintre replicare și efectul inductor de mutații, agenții mutageni chimici se împart în două categorii : *a)* mutageni care modifică acidul nucleic fără necesitatea replicării, ca acidul nitros, hidroxilamina, nitrosoquanidina, etilmetansulfanatul și proflavina ; acești agenți sînt folosiți pentru tratarea de suspensii virale înaintea inoculării pe substratul celular-gazdă de multiplicare ; *b)* agenți mutageni care se încorporează în ADN sau ARN în procesul replicării ; aceștia sînt analogi ai bazelor pirimidinice, ca 5-bromodezoxiuridina și 5-fluorouracilul, sau analogi ai bazelor purinice, ca 2-aminopurina ; cea de-a doua categorie nu acționează asupra virionilor ca particule în repaus și nici asupra acidului nucleic infecțios. Mutagenii analogi se adaugă în mediul culturilor celulare infectate în momente care precedă replicarea. Gazdele cele mai utilizate pentru propagarea virionilor expuși mutagenezei sînt culturile celulare.

În conformitate cu aserțiunea că prin mutageneză se induc evenimente mutaționale care pot avea loc și spontan, dar cu o frecvență mult mai rară, calitatea de mutagen poate fi atribuită unui agent oarecare numai atunci cînd, prin aplicarea lui, rata mutației spontane cel puțin se dublează. De exemplu, dacă rata mutației spontane este de 1×10^{-5}/genă/replicare, prin mutageneză se ajunge la cel puțin 2×10^{-5}/genă/replicare. Toți agenții mutageni clasici cresc rata de mutație, în condiții îngrijite de lucru, la valori mult mai mari decît cea minimă (Freese, 1963).

8.4.3. CARACTERE-MARKER ALE EVENIMENTELOR MUTAȚIONALE SPONTANE SAU INDUSE. TIPURI DE MUTANȚI

Caracterele fenotipice, indiferent de nivelul de observare, reflectă regiuni genetice, gene sau fragmente de genă din genom. Rezultă că orice schimbare stabilă de fenotip viral corespunde unei modificări genomice virale, iar diferența fenotipică dintre virusul de tip sălbatic și virusul mutant marchează sau remarcă evenimentul mutațional generator al mutantului și, implicit, marchează și caracterizează mutantul respectiv. Ca urmare, caracterul fenotipic, luat în observare, care marchează diferența obținută prin mutație se numește caracter-marker. De exemplu, șirul de gazde devine marker *hr* cînd, consecutiv unei mutații, șirul de gaze al tipului sălbatic de virus devine schimbat la virusul mutant. Se testează cel puțin două gazde. Pentru ilustrare subliniem testările efectuate de Fenner și colab. (1974) cu virusul stomatitei veziculoase față de două gazde, fibroblaste embrionare de găină și celule HeLa. Pe cînd tipul sălbatic de virus creștea numai pe fibroblaste aviare și nu se multiplica pe HeLa, unii mutanți de virus creșteau pe ambele gazde. Astfel, *hr* în sistemul respectiv este un caracter-marker.

Pentru analizele moleculare, mulți din markerii observabili prin efecte macroscopice ale virusurilor au devenit insuficienți, deoarece indică regiuni genetice întinse corespunzătoare la mai multe gene.

Mutanții caracterizați însă prin markeri de patogenitate, șir de gazde, forma plajelor au constituit începutul analizelor genetice virale și au permis apoi descoperirea substratului molecular intim al evenimentului mutațional care i-a generat. Este de subliniat încă o dată, în context, că markerul de patogenitate al virusului rabic fix, mutant izolat experimental cu un secol în urmă și de importanță majoră practică pentru vaccinarea antirabică, este precizat în prezent că s-a datorat unei mutații de substituire a unui singur nucleotid (Dietzschold și colab., 1983). Din acești markeri de început au derivat markerii condiționat-letali care caracterizează mutanții condiționat-letali. Aceștia sînt utilizați și în prezent, motiv pentru care vor fi descriși în continuare.

Caractere-marker condiționat-letale și mutanți condiționat-letali. Markerii condiționat-letali constau din diferențele de creștere între virusurile de tip sălbatic și virusurile mutante (derivate fie spontan, fie prin mutageneză indusă din primele), în condiţii experimentale impuse. De exemplu, markerul de termosensibilitate (cf. engl. *temperature sensitive*) constă în inhibiţia replicării virusului mutant la o temperatură mai mare cu cîteva grade decît temperatura obişnuită de incubaţie la care mutantul se multiplică. Respectiva creştere de temperatură nu influenţează multiplicarea virusului sălbatic ; ultimul se multiplică la ambele temperaturi.

Mutanţii posesori ai acestui marker se numesc mutanţi de termosensibilitate *(temperature sensitive)* sau *ts*. Mecanismul constă din schimbarea secvenţei de aminoacizi din structura primară a proteinei corespunzătoare genei afectate în timpul evenimentului mutaţional. Modificarea structurii primare se reflectă apoi în structura secundară şi în cea terţiară a proteinei interesate precum şi în capacitatea ei de interacţiune proteină — proteină, proteină — acid nucleic, asamblări capsomerice. Respectivele modificări determină ca funcţiile proteinei să fie alterate la o temperatură cu cîteva grade mai mare decît temperatura optimă de multiplicare şi, ca urmare, să apară inhibiţia creşterii. Obţinerea de mutanţi *ts* necesită un sistem de culturi celulare optim pentru formarea de plaje. Virusul în lucru este mai întîi clonat la temperatura restrictivă (valoarea inhibitoare pentru mutanţii de obţinut, de exemplu, 40°C), pentru a elimina mutanţii spontani care pot apărea ca subclone în populaţia de experienţă. Clona astfel purificată este expusă mutagenului potrivit (testat în prealabil pentru efectul inactivant). Supravieţuitorii sînt inoculaţi pe plăci de culturi celulare şi se incubează la temperatura permisivă (valoarea obişnuită de cultivare, de exemplu, 37°C). După apariţia plajelor, acestea sînt replicate în număr mare în culturi separate şi incubate la temperatura permisivă. Virusurile obţinute sînt replicate pe cîte două tuburi separate de fiecare şi sînt incubate apoi unul la temperatura restrictivă şi altul la cea permisivă. Virusurile care nu dau efect citopatic la temperatura restrictivă sînt mutanţi *ts*. Mutanţii *ts* obţinuţi sînt apoi retestaţi pentru retromutaţii (mutaţii inverse), deoarece multe clone mutante pînă la prima etapă de testare a markerului *ts* descrisă mai sus prezintă o mare frecvenţă de reversie. Mulţi mutanţi *ts* se dovedesc apoi, după pasaje seriate, că au caracterul *ts* mai puţin net, cu inhibiţie incompletă la temperatura restrictivă, ceea ce s-a numit *leakiness* (marker incomplet). Astfel de mutanţi, incompleţi, nu se potrivesc principiului net de „da sau nu“ şi sînt în general eliminaţi din analize genetice ulterioare (vezi subcapitolul 8.5). Oricum, obţinerea şi analiza mutanţilor *ts* la virusuri animale au fost inspirate din tehnicile utilizate în genetica bacteriofagilor (Luria, 1962 ; Fenner, 1970). Toate virusurile umane capabile de cultivare pe culturi de celule au fost obiectul studiilor genetice cu mutanţi *ts* (virusurile polio, virusurile gripale şi paragripale, reovirusurile, adenovirusurile, herpesvirusurile etc.). Mutanţii *ts* sînt utilizaţi şi în prezent pentru analize la nivel molecular ale funcţiilor exercitate de diferitele proteine virale, chiar în condiţii de mare precizie a determinărilor de secvenţe complete ale genomurilor virale şi ale proteinelor corespunzătoare.

O mare parte din mutanţii *ts* sînt mai puţin virulenţi pe gazda specifică decît tipul sălbatic, motiv pentru care sînt folosiţi intermediar pentru a selecta virusuri atenuate pentru vaccinare. Multe din tulpinile atenuate de virus care se află la originea preparării vaccinurilor umane au fost derivate din tipul sălbatic, prin multiplicarea acestuia în gazde noi, ca oul embrionat și culturi celulare, la temperaturi joase, de exemplu 30°C în loc de 37°C sau 39°C. Tulpinile atenuate prin metoda cultivării la rece, frecvent, s-au dovedit a fi mutanți *ts*.

O altă categorie de mutanți condiționat-letali o constituie mutanții dependenți de gazdă, denumiți *hd*. Descrierea lor a fost tot consecința cultivării virusurilor *in vitro* pe culturi celulare iar tehnica plajelor a constituit baza definirii caracterelor-marker.

Caracterul-marker constă în diferența de multiplicare a clonelor-mutant pe un grup de linii celulare, față de virusul de tip sălbatic de plecare. Linia celulară care permite multiplicarea virusului mutant și a celui sălbatic se numește *gazdă permisivă*. Linia celulară care nu permite multiplicarea virusului mutant, dar permite multiplicarea virusului de tip sălbatic se numește *nepermisivă*, aceasta fiind condiționat-letală pentru mutant. Deci, evenimentul mutațional generator al unui mutant *hd* a modificat virusul de tip sălbatic în așa fel încît în forma mutantă devine abortiv în infecția pentru o gazdă altminteri permisivă. De exemplu, Takemori și colab. (1968) au izolat prin mutageneză cu ultraviolete mutanți *hd* de la clone de adenovirus 12 incapabile să producă plaje pe o linie particulară de celule KB, deși clonele inițiale considerate de tip sălbatic produceau plaje caracteristice pe linia respectivă. Mulți mutanți *hd* obținuți cu diferite virusuri au fost simbolizați cu inițialele liniei celulare nepermisive. De exemplu, cei descriși mai sus au fost numiți *kb*. De fapt, primul studiu sistematic al mutanților *hd* a fost realizat de McClain (1965) prin cercetarea virusului pox al iepurelui. În respectivul studiu s-a constatat că unii din mutanții *u* (care dau papule albe pe membrana corioalantoidiană) nu cresc pe culturi de celule PK *(pig kidney cells)* iar alții cresc. Cei care sînt condiționați în letalitate (absență de multiplicare) de celulele PK au fost numiți *PK*. Studiile moleculare ale unei serii de mutanți *PK* au demonstrat că respectivii mutanți sînt heterogeni în alterările funcționale ; ei infectează celulele restrictive dar au incapacități funcționale variate : unii sînt blocați în replicare, alții în diferite etape tardive ale morfopoiezei virionice. Mutanți *hd* numeroși au fost descriși și studiați la dezoxiribovirusurile oncogene (papovavirusurile, adenovirusurile și herpesvirusurile) și sînt menționați ca fiind utilizați în continuare pentru studii de biologie virală.

Mutanții condiționat-letali dau de obicei infecție abortivă în condiția nepermisivă, letală. Prin *infecție abortivă* se înțelege o formă de infecție virală în care, deși virionii pătrund în celula-gazdă, infecția respectivă nu duce la progenie infecțioasă. Multe din componentele virale sînt produse endocelular, dar nu se pot asambla și, ca urmare, nu duc la morfopoieză de virioni maturi. Infecția abortivă în gazdele nepermisive (restrictive) rezultă din faptul că celulele-gazdă nu produc unii factori necesari multiplicării virale : un ARNt capabil să deblocheze alterarea mutațională, o enzimă sau o proteină cu alte activități care suplinesc defectul mutațional viral. Virusurile care dau infecții abortive sînt numite și *virusuri defective*. Virusurile defective pot rezulta și din suprimări fizice ale unei părți din genom, așa cum sînt descrise virusurile polio sau virusurile gripale. Virusurile defective pot fi „salvate" din infecția abortivă prin infectarea concomitentă cu un virus ajutător *(helper virus)*. Infecția abortivă este convertită atunci în infecție productivă și celula-gazdă a coinfecției produce ambele tipuri de virusuri, cel mutant și cel *helper*. De exemplu, Levine (1984) menționează un mutant *ts* de adenovirus serotip 12 care dă infecție productivă la temperatura restrictivă în prezența coinfecției cu virusul simian 40. Respectivul mutant *ts* producea o proteină necesară inițierii sintezei de ADN care era nefuncțională la temperatura restrictivă. Coinfecția cu SV40 ducea la sinteza de antigen T cu capacitatea de a suplini funcția proteinei alterate, și atunci replicarea mutantului *ts* devenea posibilă, fiind „salvat" prin ajutorul dat de SV40. La numeroase virusuri se descriu forme defective de salvare prin coinfecție (Luria și colab., 1978).

Infecția cu particule virale defectiv-interferente (DI) poate duce, în afară de interferență cu virus complet, la modificări celulare de tipul blocării metabolismului celulei-gazdă ; de asemenea, particulele defective pot induce formarea de antigene noi sau pot declanșa transformarea tumorală.

Mutanți virali rezistenți la inhibitori ai creșterii și multiplicării virale. Tendința firească de a găsi agenți inhibitori ai multiplicării virusurilor, asemănători antibioticelor de la bacterii, a dus la descoperirea mai multor agenți antivirali, dintre care unii s-au dovedit utilizabili. Principalul criteriu de selecție privind utilitatea lor a fost inocuitatea lor la doze inhibitoare pentru agentul viral. Un alt criteriu a fost frecvența de mutație spre rezistență. Caliguiri și Tamm (1973) descriu efectul inhibitor exercitat de guanidină și de hidroxibenzilbenzimidazol (HBB) asupra unor enterovirusuri (virusurile polio, Coxsackie și ECHO). Fiecare din cei doi agenți induc o infecție abortivă : în prezența unuia din ei celulele internalizează virusul fără ca evenimentele de endocitoză virală să fie urmate de producerea, în cantități detectabile, de ARN viral sau proteine virale, ca în infecția obișnuită. Adăugate în timpul fazelor de multiplicare, ulterior pătrunderii virusului, agenții respectivi nu inhibă sinteza proteinelor virale dar inhibă apariția de ARN viral monocatenar ca genom finisat pentru încapsidare. Rata de apariție a mutanților spontani de rezistență la guanidină și HBB este foarte mare (Luria și colab., 1978). S-a constatat că mutanții guanidinrezistenți sînt parțial rezistenți la HBB și viceversa. Mutanții rezistenți și la alți agenți ai chimioterapiei antivirale (vezi capitolul 13) au impus drept criteriu de apreciere a valabilității metodelor chimioterapice și testarea potențialului de apariție mutațională a chimiorezistenței la virusurile implicate.

Diferitele categorii de mutanți virali obținuți prin selecția celor spontani sau prin mutageneză au fost și sînt în continuare de mare importanță, din următoarele motive :

— constituie materialul de bază pentru studiul funcțiilor îndeplinite de diferite gene din genomul viral, deoarece, ca și la om, multe funcții au fost descoperite prin disfuncție ;

— sînt de mare utilitate pentru tehnologia obținerii de vaccinuri ;

— permit aprecierea evoluţiei epidemiilor în cazul virozelor respiratorii gripale ;

— au constituit baza cartografierii genelor în hărţi genetice clasice luate şi în prezent ca referinţă pentru hărţile genetice de secvenţiere a acizilor nucleici-genomuri ale virusurilor.

8.5. RECOMBINAREA LA VIRUSURI UMANE. HĂRŢI GENETICE CLASICE

Împreună cu mutaţia, recombinarea constituie mecanismul prin care acizii nucleici, ca material genetic, exercită funcţia de variabilitate generatoare a polimorfismului şi evoluţiei organismelor. Virusurile nu fac excepţie de la această aserţiune, deoarece în condiţii prielnice manifestă recombinări. Prin recombinare la virusuri se înţelege interschimb de segmente de acid nucleic între genomurile aparţinînd unor virusuri diferite ; din acest interschimb rezultă progeni virali (progenituri virale) cu noi combinări de gene şi, implicit, cu noi asocieri de caractere fenotipice. Un interschimb este consecinţa unui eveniment de recombinare. Pentru producerea unui eveniment de recombinare este necesar ca moleculele de acid nucleic ale virusurilor să se afle în condiţii de interacţiune. Cel puţin trei condiţii *sine qua non* sînt cerute pentru recombinarea intervirală : *1*) genomurile virusurilor diferite să se afle în aceeaşi celulă, condiţie îndeplinită de infecţia simultană (coinfecţie sau infecţie mixtă). *2*) Genomurile celor două virusuri să aibă omologii structurale ale acizilor nucleici. *3*) Celula-gazdă să producă factorii necesari interschimburilor de segmente ale recombinării. În conformitate cu aceste condiţii, bineînţeles că nu s-au descris recombinări între virusuri ADN şi virusuri ARN (neomologie fundamentală) şi că, foarte rar, s-au descris recombinări între dezoxiribovirusuri din grupări taxonomice diferite (de exemplu între adenovirusuri şi SV40 din grupul Papova). În mod obişnuit, recombinările se produc între mutanţi diferiţi ai aceluiaşi tip de virus sau între tulpini diferite. Pentru ca evenimentele de recombinare să fie relevante, virionii angajaţi trebuie să fie purtători de markeri. Cei mai utili markeri s-au dovedit markerii de termosensibilitate *(ts)*, deoarece ei pot remarca oricare din proteinele structurale sau nestructurale corespunzătoare la gene diferite din genom. Ca urmare, recombinările genetice cel mai mult studiate au fost cele obţinute cu mutanţi *ts*. Studiile de recombinare au putut fi efectuate la virusuri capabile să se multiplice pe culturi celulare sau pe oul embrionat. Virusurile cu un spectru de gazdă îngust, limitat doar la om şi cimpanzeu, cum sînt virusurile hepatitei B, nu au putut fi studiate prin recombinări şi nici nu li s-au descris mutanţi *ts*.

În conformitate cu structurile genomice ale virusurilor umane (vezi fig. 8-3), recombinările virale se împart în două categorii : *1*) recombinări intramoleculare care implică reasocieri de segmente ale moleculelor de acid nucleic angajate în interschimb, din care rezultă o moleculă-genom cu segmente liniare reasortate ; 2) reasortări genetice în care molecule separate aparţinînd la genomuri plurimoleculare se reasociază în genomuri recombinante.

Virionii posesori de reasocieri genice se numesc recombinanţi.

8.5.1. RECOMBINAREA INTRAMOLECULARĂ, COMPLEMENTAREA ŞI HĂRŢI GENETICE VIRALE

Recombinarea intramoleculară este demonstrată la virusurile ADN cu genom liniar monocatenar sau bicatenar, cît şi la virusurile cu genom circular. Ea a fost descrisă la virusurile pox, herpes, adeno şi s-a bizuit pe infecţia mixtă concomitentă cu mutanţi purtători de markeri. Recombinarea intramoleculară a fost neîndoielnic demonstrată şi la ribovirusuri cu genom monocatenar monomolecular. Recombinarea intramoleculară necesită schimbări conformaţionale şi dispuneri spaţiale ale moleculelor de acid nucleic, cît şi ruperi segmentare cu interschimb şi reasociere colinară a segmentelor (fig. 8-7), ca într-un veritabil *crossing over* morganian. Spre deosebire însă de acesta, caracterizat prin interschimb reciproc de segmente, la virusuri interschimbul nu pare a fi reciproc. Din două molecule genomice diferite rezultă un genom întreg recombinant şi resturi moleculare care se pierd. Dacă la bacteriofagi s-au descris gene codificatoare de endonucleaze, polimeraze reparatoare şi gene *rec* (de *recom*binare) producătoare de factori conformaţionali ai dispunerii moleculare din recombinare, virusurile animale îşi au evenimentele de recombinare bazate mai mult pe factorii de recombinare ai celulei-gazdă. Ca şi la alte forme de organizare a materiei vii, recombinarea a fost utilizată pentru stabilirea de hărţi genetice ale genomurilor virale. Pentru cartografiere s-au folosit mutaţii *ts*, în special datorită obţinerii lor mai facile şi mai ales datorită faptului că pot fi de tot atîtea feluri cîte gene se află în genomul viral. Este de menţionat, chiar pentru virusuri, că hărţi complete au fost realizate rareori de cîteva grupe de cercetători (Levine, 1982 ; Loeffler, 1984 ; Lemon, 1985). Hărţile genetice virale complete au necesitat eforturi susţinute în laboratoare multiple ; stabilirea unui lincaj numai între două gene a constituit subiectul de o deosebită originalitate al unei singure lucrări, iar construcţia unei hărţi complete clasice a costat mult în bani şi eforturi conjugate. Harta genetică prin recombinare s-a stabilit în cel puţin trei etape : *1)* obţinerea de mutanţi *ts* într-un număr semnificativ de mare ; *2)* testarea prin teste de complementare pentru împărţirea lor în grupe ; *3)* recombinarea între grupele de complementare pentru precizarea distanţei dintre markeri. Prin aceste etape se urmăreşte în final modul de interconectare secvenţială a genelor în macromolecula de acid nucleic care este genomul viral. Pînă aici s-a descris modul în care se obţin mutanţii virali, *ts, hd* sau de rezistenţă la inhibitori. S-a mai menţionat, mai ales pentru mutanţii *ts*, marea diversitate a lor în privinţa genelor interesate şi proteinelor corespunzătoare : *a)* mutanţi *ts* în care proteina termosensibilă poate face parte din grupul proteinelor nestructurale timpurii ; *b)* mu-

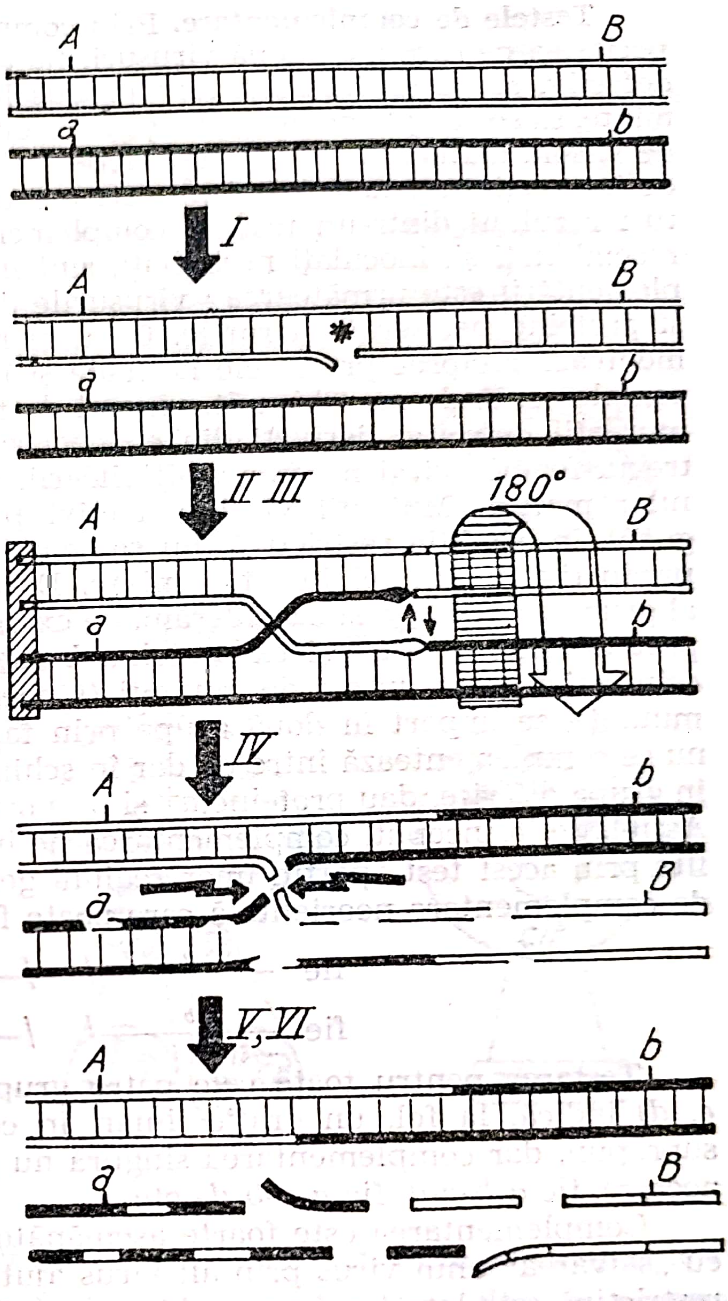


Fig. 8-7 — Recombinare intramoleculară între genomurile a doi mutanţi, *AB* respectiv *ab*. *I* — crestarea monocatenară (*) a genomului *AB* ; *II*, *III* — migrarea unui capăt crestat cu abordarea genomului *ab* destabilizat, secţionat la rîndul lui şi stabilirea unui heteroduplex cu monocatene încrucişate ; ⇓ — rotirea catenelor în partea *B* şi *b*, în timp ce porţiunile *A* şi *a* stau (|≡|) ; *IV* — acţiunea unor enzime de prelucrare care desfiinţează structura heteroduplex labilă ; *V*, *VI* — refacerea unui genom recombinant *Ab* din cei doi parentali *AB*, *ab*. (La virusuri — cel puţin bacteriofagi — nu s-a demonstrat schimb reciproc între genomuri în cadrul unui singur eveniment de rupere — reunire — recombinare ; structurile monocatenare încrucişate sînt labile şi induc rapid activităţile enzimelor de recombinare.)

tanţi *ts* în care proteinele afectate şi, implicit, genele lor fac parte din grupul angajat în replicare ; *c)* mutanţi *ts* pentru proteinele nestructurale tardive ; *d)* mutanţi *ts* pentru proteinele structurale de împachetare genomică şi pentru proteinele structurale capsidice. Deci markerul *ts* este subdivizat în numeroşi markeri *ts* care corespund unor regiuni genetice sau gene diferite din genom ; după descrierea de mai sus, pentru facilitarea descrierii, vom considera deci patru grupe : *a*, *b*, *c*, *d*. Înainte de încercările de recombinare pentru cartografiere, amintim că mutanţii *ts* de utilizat nu cresc la temperatura restrictivă şi că nu există o orientare a setului de mutanţi în grupe distinctive în care fiecare grupă să cuprindă mutanţii *ts* ce au afectată aceeaşi regiune genetică sau genă. Acest lucru se stabileşte prin testul de complementare, ale cărui rezultate reprezintă o premisă obligatorie pentru recombinarea de cartografiere.

Testele de complementare. Prin complementare virală se înțelege capacitatea pe care o au două virusuri, fie ambele defective, fie numai unul defectiv, să se suplinească prin produsele lor genice în timpul infecției mixte, să se complementeze, în așa fel încît să-și asigure reciproc producția de virioni maturi în condiția restrictivă. Complementarea este un fenomen de interacțiune fenotipică și nu este o recombinare genetică. Virionii maturi rezultați dintr-un test de complementare sînt tot defectivi, nu sînt recombinați și, inoculați neasociați, sînt în continuare *ts*. Explicația complementării este următoarea : virusurile defective în gene diferite produc și proteine nealterate normale. Ca urmare, cele două virusuri își suplimentează reciproc proteinele normale și își corectează reciproc fenotipul, complementîndu-se. Obișnuit, virusul de tip sălbatic complementează toți mutanții defectivi derivați din el, deoarece virusul sălbatic produce întregul fenotip viral necesar multiplicării, maturării și morfopoiezei virionilor maturi. Mutanții virali defectivi pentru aceeași proteină (aceeași genă), în condiția restrictivă, nu se complementează și nu dau infecție productivă în timpul infecției mixte. Dacă reluăm exemplul de mai sus al grupelor *a, b, c, d* și considerăm, de exemplu, că proteina *a* este mutanta proteinei normale a^+ și că proteina *b* este mutanta normalei b^+, atunci coinfectăm mixt un set de mutanți *ts* necunoscut pînă cînd observăm că mutanții se împart în două grupe prin faptul că mutanții dintr-un grup nu se complementează între ei, dar în schimb se complementează cînd sînt în grupe diferite, dau proteine a^+ și b^+ normale și virioni maturi (fig. 8-8). Astfel, de la început, complementarea ne indică sugestiv că grupele stabilite prin acest test aparțin unor regiuni genetice diferite și ne dă o hartă de complementare neorientată care poate fi înscrisă într-un grafic liniar :

fie $\overset{a}{\overline{\qquad\qquad}}/\;\;/\overset{b}{\overline{\qquad\qquad}}$

fie $\overset{b}{\overline{\qquad\qquad}}/\;\;/\overset{a}{\overline{\qquad\qquad}}$

Testarea pentru toate cele patru grupe de mutanți *ts* posibili *(a, b, c, d)* indică, la fel, un grafic liniar, în care markerii *a, b, c, d* nu se suprapun, dar complementarea singură nu poate stabili modul de interconectare, fie *a-b-c-d*, fie *a-c-b-d-* etc.

Complementarea este foarte asemănătoare ca mecanism de producere cu „salvarea“ unui virus prin alt virus ajutător *(helper)*, deoarece condiția restrictivă este letală pentru ambii mutanți luați separat, iar în coinfecție, luați împreună, condiția restrictivă nu mai este letală, mutanții salvîndu-se reciproc.

Complementarea are calitatea să contribuie la definirea genei ca unitate de funcție, deoarece demonstrează că doi sau mai mulți mutanți cu același fenotip sînt defectivi în aceeași funcție moleculară, adică produc același polipeptid alterat. De la însușirile complementării în infecții mixte s-a ajuns la testul cis-trans, la noțiunea de cistron, la considerentul că gena nu mai este unitate de funcție și la tendința înlocuirii noțiunii de genă cu noțiunea de cistron. Problema cistronului a pornit de la analiza unei regiuni genetice din genomul bacteriofagului T4 analizată prin mutanți *hd*. S-a observat că unii mutanți de T4 cresc pe *E. coli* B, pe care dau liză rapidă și plaje mai clare, dar nu cresc pe *E. coli* K, lizogenă pentru fagul λ. Fagul T4 de tip sălbatic se multiplică și liberează ambele tulpini. Markerul *hd*, respectiv de liză rapidă, a fost numit *rII* și corespunde geno-

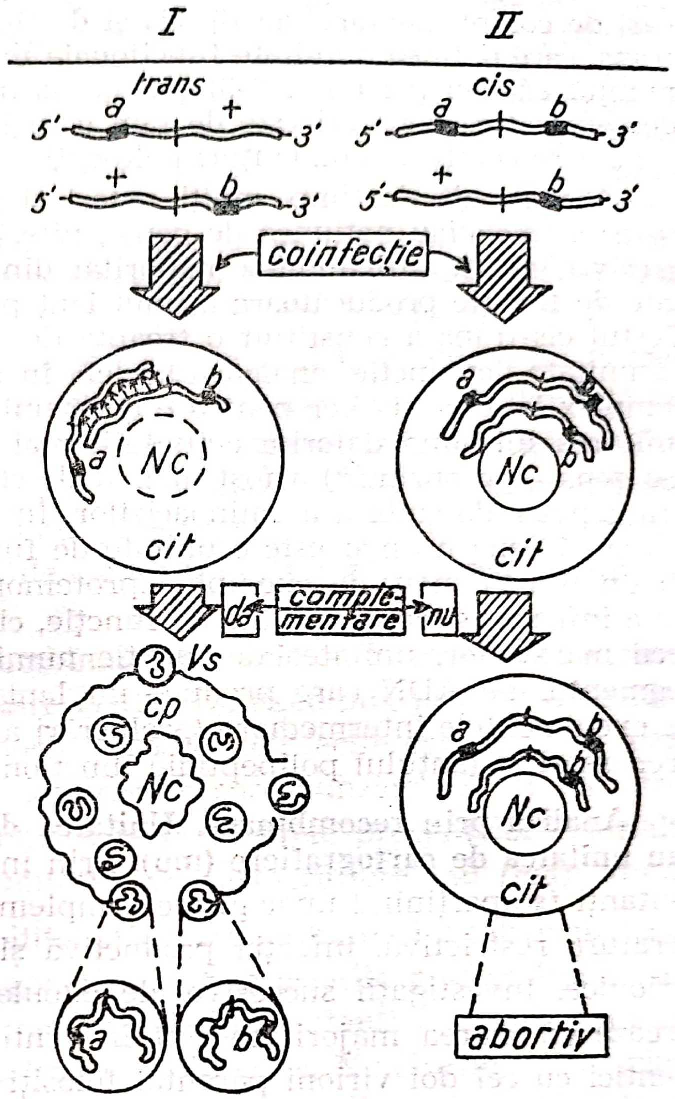


Fig. 8-8 — Testul cis-trans din complementarea intervirală în cadrul infecției mixte.

I — coinfecția celulelor cu doi mutanți monodefectivi în *a*, respectiv în *b*, duce la situația ca regiunile nemutante corespunzătoare (+) să producă setul complet de factori necesari multiplicării și morfopoiezei virionilor ; aceasta are loc deoarece mutațiile *ab* se găsesc pe genomuri diferite (în poziție trans) ; *II* — un mutant dublu-defectiv în ambele locusuri *a* și *b* (poziție cis) chiar însoțit în coinfecție cu un mutant simplu, *b*, nu poate produce factorii multiplicării. (Mutantul simplu nu produce decît factori *a* ; ca urmare, alterările cis nu se complementează și au ca rezultat infecție abortivă. Prin cele două experiențe cis și trans se demonstrează că segmentele *a* și *b* sînt cu funcții separate și s-au numit *cistroni*.)

mic unei gene rII. Benzer (1959, 1961), analizînd prin teste de complementare prin coinfecție mii de mutanți *rII*, a constatat că, deși ei vizează aceeași genă, totuși se complementează, fapt care i-a permis să-i împartă în două clase, A și B. Coinfecția a doi mutanți *rII* din clasa A, de exemplu *rII* A1×*rII* A3 nu dădeau liză pe *E. coli* K (λ), deci nu se complementau, iar coinfecțiile cu mutanți *rII* A×mutanți *rII* B dădeau liză pe *E. coli* K (λ), deci se complementau. Complementarea intragenică demonstra că gena rII nu este o unitate de funcție, ceea ce părea că anula un caracter definitor pentru noțiunea de genă. Complementarea avea loc numai cînd schimbările mutaționale *rII* A și *rII* B se aflau pe genomuri diferite, adică în poziție trans.

Mutanții dubli, cei care aveau schimbări mutaționale și în A și în B, adică în poziție cis, în același genom, nu aveau capacitate de complementare cu oricare din mutanții *rII* fie A, fie B. Cele două tipuri de încercări de complementare, de tip cis şi de tip trans, au constituit testul cis-trans, care definea o unitate funcţională mai mică decît gena rII, unitatea numită *cistron* (vezi fig. 8-8) (de la cis-trans). Cercetările ulterioare au demonstrat că gena rII este de fapt o regiune genetică formată din două gene care codifică două lanţuri polipeptidice diferite.

O perioadă de timp, mulţi autori şi-au însuşit noţiunea de cistron, cu care înlocuiau noţiunea de genă ; ulterior, această noţiune a fost progresiv părăsită, utilizîndu-se majoritar din nou termenul de genă ca unitate de funcţie producătoare a unui lanţ polipeptidic fenotipic funcţional. Testul cis-trans a constituit o treaptă de aprofundare a noţiunii de genă ca unitate de funcţie, analoagă aceleia în care s-a dovedit că un caracter complex luat ca marker pentru o genă unitară s-a dovedit a fi heterogen, finisarea lui fiind datorită activităţii mai multor enzime. Acest moment („o genă — o enzimă“) a fost marcat de studiile lui Beadle şi Tatun asupra genelor de sinteză a aminoacizilor. În acel moment nu s-a făcut afirmaţia că gena nu mai este o unitate de funcţie şi nici nu a fost înlocuită cu un termen nou, de exemplu „proteinon“. Ca urmare, testul cis-trans nu a infirmat gena ca unitate de funcţie, ci, conform aprofundării cunoaşterii markerilor, unitatea de funcţie numită de clasici genă a devenit segmentul de ADN care produce un lanţ polipeptidic matur, indiferent de evenimentele intermediare (prelucrări ale ARNm, prelucrări de macroprecursori ai lanţului polipeptidic funcţional, ca în cazul virusului polio).

Analiza prin recombinare. Unitatea de recombinare (centimorganul) sau unitatea de cartografiere (mu). Prin infecţie mixtă (coinfecţie) cu doi mutanţi *ts* aparţinînd unor grupe complementare diferite are loc, la temperatura restrictivă, infecţia productivă şi obţinerea unei mari progenii virionice. Investigaţii succesive ale populaţiei virionice progene demonstrează că marea majoritate sînt în continuare virioni defectivi simpli, identici cu cei doi virioni parental folosiţi în infecţia mixtă. Totuşi, un procent din totalul de virioni sînt sau defectivi în ambii markeri ai celor două grupe de complementare sau sînt de fenotip sălbatic.

Aceştia au, cu alte cuvinte, reasociaţi markerii celor două grupe la acelaşi virion, iar reasocierea se menţine ereditar ; reasocierea indică deci un eveniment de recombinare intragenomică, deoarece se menţine ereditar ; virionii cu reasocieri se numesc recombinanţi. Reluînd exemplul descriptiv al grupelor de complementare menţionate mai sus, adică grupele *a, b, c* şi *d,* şi efectuînd coinfecţii repetate de cîte doi mutanţi, fie $a+b$, fie $a+c$, fie $b+c$ etc., s-a observat că procentul de recombinanţi nu este acelaşi pentru fiecare tip de coinfecţie. De exemplu, distribuţia procentuală a recombinanţilor este astfel :

— coinfecţia $a+b$	recombinanţi	6%
— coinfecţia $a+d$	recombinanţi	15%
— coinfecţia $a+c$	recombinanţi	9%
— coinfecţia $d+c$	recombinanţi	6%
— coinfecţia $b+d$	recombinanţi	9%

Conform principiului morganian, cu cît distanța dintre gene este mai mare, cu atît numărul de *crossing over* (ruperi și reasocieri) are probabilitatea să fie mai mare și cu atît numărul de recombinanți va fi proporțional mai crescut. Deci, procentul de recombinanți constituie o evaluare a distanței dintre markeri, deoarece există o proporționalitate directă între distanță și procente. Astfel, unitatea de recombinare este unitatea procentuală de recombinanți (1%) și pentru că a fost definită de Morgan prin studii genetice la *Drosophila,* efectuate la începutul secolului nostru, unitatea poartă numele de *centimorgan.* Din exemplul convențional luat mai sus, procentele de recombinanți obținuți din coinfecții diferite ne permite să apreciem, în conformitate cu principiul morganian, nu numai distanța în centimorgani dar și modul de succesiune al markerilor față de unul din ei luat ca referință. La virusurile umane, mărimea genomului fiind extrem de mică față de mărimea moleculară numai a unui cromozom uman sau animal în general, atunci este normal ca procentul de recombinanți din oricare împerechere de coinfecție să nu depășească un anumit nivel procentual.

Ca urmare, procentele recombinaționale cele mai mari sînt extreme și sînt normalizate prin interpolare la 100. De exemplu, procentul de 15% al recombinanților în împerecherile $a \times d$ de coinfecție este cel mai mare din toate celelalte procente și-l considerăm corespunzător cifrei 100. Prin regula de trei simplă aflăm atunci corespondentele procentelor celorlalte împerecheri, și astfel se află unitățile de cartografiere mu *(map units).*

Hărți genetice clasice stabilite prin recombinare și analize moleculare ale mutanților ts. Hărțile genetice sînt înscrierile grafice liniare ale markerilor genetici pe care îi posedă diferiții mutanți analizați prin recombinări rezultate din împerecheri de coinfecție. Nivelurile de înscriere în hartă sînt determinate de unitățile de cartografiere, iar unitățile de cartografiere sînt deduse din procentul de recombinanți (centimorgani). Astfel, grupele de complementare *a, b, c* și *d* studiate prin împerecheri de coinfecție în variante diferite pentru control reciproc are ca rezultat o hartă liniară ca în fig. 8-9.

Astfel de hărți liniare au fost demonstrate pentru toate virusurile cu genom liniar. Unele virusuri cu genom circular, ca virusurile Papova (SV40, polyoma) au avut o distribuție a mutanților *ts* în care distribuțiile procentuale nu indicau markeri de extremități (vezi fig. 8-9). Studiile moleculare ale proteinelor produse în infecțiile abortive ale diferiților mutanți *ts* și raportarea respectivelor proteine la nivelurile de cartografiere au permis reprezentarea proteinelor conform unităților de cartografiere. Distribuția mutanților *ts* și a genelor pentru virusul polio au fost mai profund precizate prin analiza macroprecursorului proteinic și a distribuției diferitelor proteine după etapele clivajului de prelucrare (vezi fig. 8-9) (vezi capitolul 6).

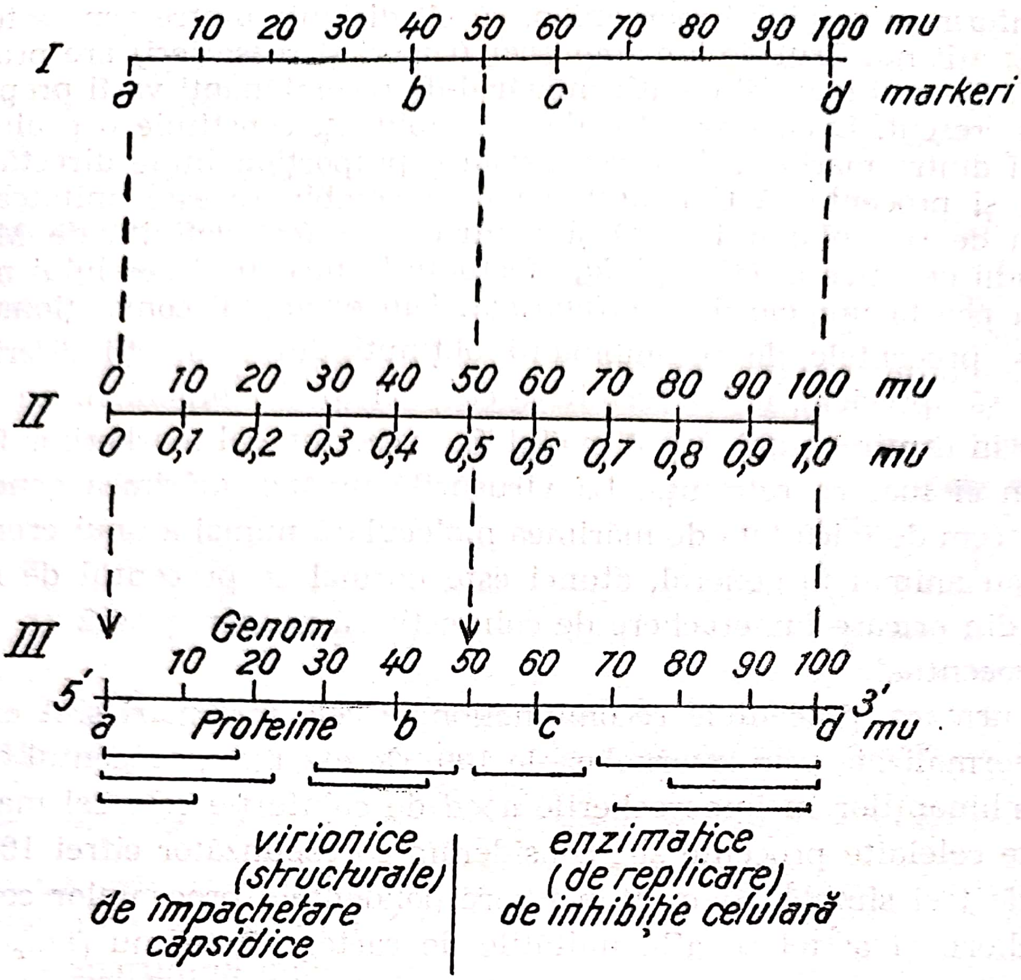

I
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 mu
a b c d markeri
II
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 mu
0 0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 0,6 0,7 0,8 0,9 1,0 mu
III
Genom
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
5′ 3′
a Proteine b c d mu
virionice (structurale) de împachetare capsidice
enzimatice (de replicare) de inhibiție celulară

Fig. 8-9 — Înscrierea într-o hartă genetică a mutanților *ts* prin procentul de recombinanți (centimorgani) sau unități de hartă *mu* (*map units*).

I — markeri *a*, *b*, *c*, *d*, distribuiți în hartă la nivelul celor 100 mu ; *II* — două tipuri de adnotări ale hărții genetice, fie 1—100, fie 0,1—1,0 ; *III* — corespondența dintre harta genetică și proteinele afectate la diversele grupe *a*, *b*, *c* și *d* de mutanți *ts*.

8.5.2. RECOMBINARE PRIN REASOCIERI GENOMICE LA VIRUSURI CU GENOMURI PLURIMOLECULARE

Așa cum este ilustrat în fig. 8-3, unele virusuri ARN au genomul format din mai multe molecule, cu caractere fizice și funcții genetice diferite. Dintre virusurile umane, virusurile gripale și reovirusurile prezintă această caracteristică. Fiecare moleculă este fizic independentă de celelalte din genom și se comportă asemănător cromozomilor din genomul uman.

În coinfecție pot rezulta interschimburi de molecule între virioni și recombinanți prin reasortări moleculare genomice, reasortări care sînt exprimate fenotipic (fig. 8-10). Pentru virusurile gripale s-au obținut cu ușurință reasortări genetice prin infecții mixte cu tulpini umane și

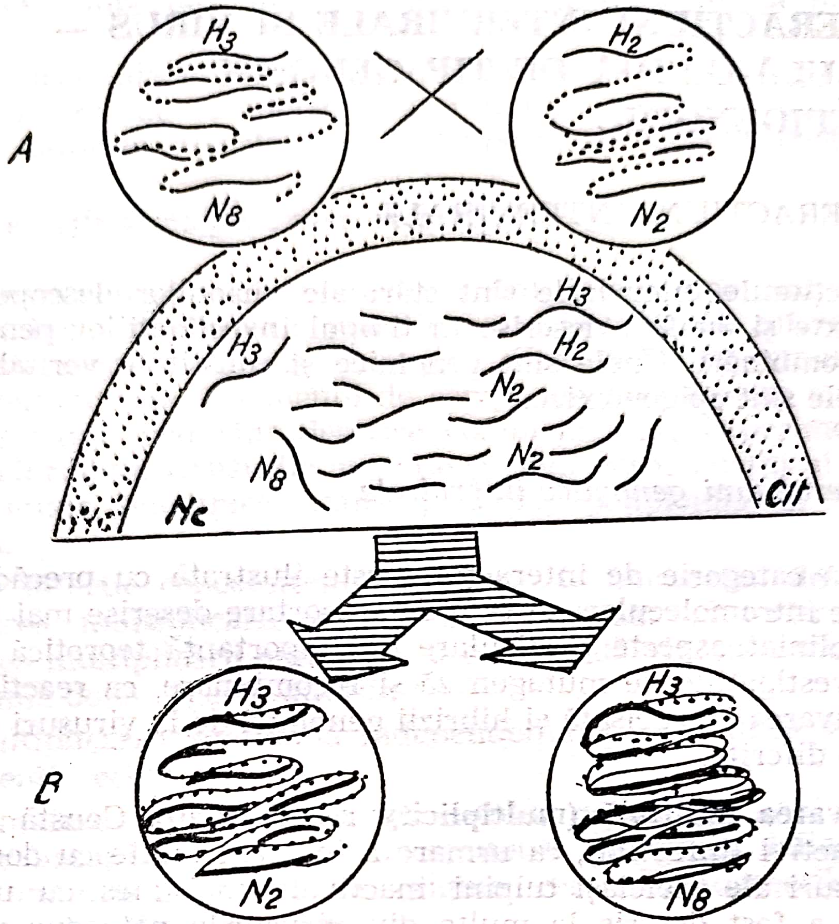


Fig. 8-10 — Recombinare prin reasociere genomică la virusul gripal cu genom segmentat.
A — în coinfecție (X) genomurile își reproduc moleculele intranuclear, în amestec; *B* — în morfopoieză procesul de încapsidare reasociază segmentele genomice în altă combinație, de exemplu H3N2 în loc de H3N8, respectiv H2N2. (Recombinanții apar printre virioni progeni identici cu parentalii.)

tulpini de virus gripal de la animale, ca păsări, cabaline și porcine (Fenner, 1976).

Recombinările prin reasortare genomică sînt facilitate și de faptul că se pot folosi ca substrat de creștere ouăle embrionate, deși s-au utilizat și culturile celulare cu posibilități mai mari de clonare (Fang și colab., 1981). Ca markeri fenotipici de reasortare au fost utilizați în particular diferențele antigenice ale subtipurilor aparținînd tipului A.

Reasortările genomice în infecțiile mixte, rata mutației spontane, spectrul de gazde naturale foarte larg determină ca dinamica evoluționistă a virusurilor gripale în epidemii să fie la un nivel mai ridicat decît la alte virusuri. Cum subtipurile gripale și tulpinile subtipurilor sînt dotate cu antigenități diferite, dar și cu proprietăți biologice diferite de multiplicare, recombinările prin reasortare sînt utilizate pentru construcția de tulpini vaccinante potrivite fiecărei perioade epidemice (Petrescu și Cajal, 1984).

8.6. INTERACȚIUNI INTERVIRALE ȘI VIRUS — CELULĂ-GAZDĂ DE TIP GENOMIC ȘI EPIGENOMIC

8.6.1. INTERACȚIUNI INTERVIRALE

Interacțiunile intervirale sînt stări ale virionilor descoperite în infecțiile mixte și au fost descrise în timpul investigațiilor pentru obținerea de recombinări. Unele sînt genomice și constituie veritabile recombinări, altele sînt epigenomice.

8.6.1.1. *Interacțiuni genomice intervirale*

Această categorie de interacțiuni este ilustrată cu precădere de recombinările intramoleculare și cele de reasortare descrise mai sus. Totuși, sînt de subliniat aspecte particulare de importanță teoretică și practică ivite în investigațiile de mutageneză și recombinare, ca reactivarea multiplă, reactivarea încrucișată și hibrizii genomici de la virusuri din grupări taxonomice diferite.

Reactivarea multiplă (multiplicity reactivation). Constă în apariția de virioni activi (infectivi), ca urmare a infecției mixte cu două sau mai multe virusuri ale aceleiași tulpini inactivate mai ales cu ultraviolete. Fenomenul a fost descris la multe din virusurile patogene pentru om, ca virusurile gripale, reovirusurile, virusurile pox. Explicația fenomenului constă în faptul că inactivarea se datorează mutațiilor letale derulate în gene diferite; de exemplu, la un virion sînt inactivate genele pentru capsidă iar genele pentru replicare sînt normale, la alt virion sînt inactivate genele de replicare dar nu sînt inactivate genele capsidei etc. Consecutiv infecției mixte, prin supliniri reciproce de multiplicare și recombinări (intramoleculare sau de reasortare) apar virioni maturi infecțioși (reactivare). Fenomenul respectiv a dus la înlăturarea ultravioletelor dintre agenții inactivanți utilizați pentru prepararea de vaccinuri (Fenner și White, 1976).

Reactivarea încrucișată (cross-reactivation). Este asemănătoare cu reactivarea multiplă și se referă la obținerea de virusuri recombinate consecutiv coinfectării celulelor-gazdă cu un virus activ și un virus inactivat, ambele virusuri fiind înrudite dar cu genotipuri distincte. Virionii rezultați conțin gene active de la virusurile inactivate.

Hibrizi genomici rezultați din virusuri taxonomic diferite. Astfel de hibrizi rezultați din recombinarea unor fragmente de genom rezultate din coinfecția mixtă au fost demonstrați cu SV40 din grupul de virusuri Papova și adeno (Butel și Rapp, 1967). Astfel de hibrizi moleculari, în care genomul liniar de adenovirus integrează liniar fragmente din genomul SV40, se datorează omologiilor de secvență nucleotidică, cît și altor omologii de comportare în privința efectelor oncogene și integrării în citogenomi.

Genomurile hibride rezultate din coinfecții cu virusuri neînrudite constituie o sursă de polimorfism și ar putea explica, atunci cînd au loc în condiții naturale, apariția de noi grupe de virusuri în evoluție.

8.6.1.2. *Interacțiuni epigenomice intervirale*

În această categorie de interacțiuni sînt descrise mai multe fenomene care nu implică schimbarea genomului viral în infecțiile mixte, în schimb se manifestă prin modificări fenotipice care dispar în cursul pasajelor. Cel mai frecvent este fenomenul de complementare descris mai sus. Asemănător acestuia mai sînt descrise complementări experimentale între virusuri neînrudite, virusurile asociate și covirusuri, sateliți ai viroizilor și virusoizi, mixia fenotipică, transcapsidația, poliploidia și interferența intervirală.

Într-o infecție concomitentă, în afară de fenomenul de interferență (împiedicarea multiplicării unui virus secundar „interferat", există și posibilitatea multiplicării simultane a celor două virusuri, multiplicare ce poate însuma două aspecte diferite :

1) multiplicarea simultană independentă a celor două virusuri, fără vreo influență reciprocă ;

2) stimularea, creșterea randamentului producției unui virus atunci cînd se realizează o infectare concomitentă cu un al doilea virus care activează anumite substanțe de origine celulară, inaccesibile în mod normal primului virus infectant.

Complementare între virusuri neînrudite. Constă din observarea experimentală a suplinirii fenotipice a multiplicării unui virus prin coinfecție a acelorași celule cu un virus neînrudit. Fenner (1970) subliniază capacitatea deosebită a adenovirusurilor de a fi implicate în acest fel de complementare. Adenovirusurile umane defective în maturare cînd infectează celulele simiene ajung să se multiplice și să producă virioni maturi în coinfecție cu virusuri simiene, ca SV40. Adenovirusul 12 complementează parvovirusuri în celule în care ultimele nu se pot multiplica singure (Ledinko și colab., 1969).

Virusuri asociate și covirusuri. Sînt descrise, tot în relație cu adenovirusurile, așa-numitele virusuri asociate acestora (*adenovirus associated viruses*, AAV), mai mici, descoperite prin examene electronooptice și care nu se multiplică decît în infecția mixtă cu adenovirusuri. Pentru AAV s-au descris patru imunotipuri. Există agenți virali denumiți covirusuri. Un exemplu îl constituie agentul delta care infectează numai oamenii și cimpanzeii infectați cu virusul hepatitei B. Structural este o moleculă mică de ARN de 0,8 kb. Covirusul delta agravează hepatitele cronice active, crescînd evident incidența mortalității (Rizzetto și colab., 1980 ; Redeker, 1982).

Sateliți ai viroizilor și virusoizii. Sateliții sînt molecule mici de ARN care necesită virusuri ajutătoare (viroizi mai ales) pentru multiplicare, nu par să codifice proteine, dar modifică simptomele induse de virusurile asociate lor (Robertson, 1983). Virusoizii sînt molecule mici, circulare, asemănătoare viroizilor ; sînt descriși la plante, dar sînt asociați infecțiilor, deosebindu-se de viroizi. Covirusul delta asociat virusului hepatitei B pare să aibă manifestări înrudite.

Mixia fenotipică, transcapsidația și poliploidia, devieri fenotipice ale coinfecțiilor și morfopoiezei virale. Prin *mixie fenotipică* se înțelege producția de virioni cu caractere fenotipice comune a două virusuri diferite, ca urmare a unei infecții mixte. În general, virusurile coinfectante trebuie să fie înrudite. Virionii cu mixie fenotipică (de exemplu, virioni cu antigene gripale și paragripale rezultați din infecție mixtă) au genomul unui singur virus din cei doi parentali și, în consecință, își pierd caracterele de mixaj în pasaje ulterioare. *Transcapsidația* este un fenomen rezultat din infecție mixtă, apare la virusurile neînvelite și constă din captarea, în cursul morfopoiezei, a genomului unui virus coinfectant în capsida celuilalt virus de coinfecție. De exemplu, genomul de virus polio poate fi încapsidat în capsida unui virus Coxsackie și viceversa. *Poliploidia* are loc numai la virusurile cu înveliș (virusurile gripale și mai ales paramyxovirusurile) și constă din prinderea în același înveliș membranal a două sau mai multe complexe nucleocapsidice. Fenner (1976) menționează că, în infecțiile mixte cu tulpini antigenic diferite de paramyxovirusuri, aproape toate particulele din progenie sînt poliploid-heteroploide iar antigenele de înveliș prezintă mixaj fenotipic.

Interferența intervirală. Constă din inhibarea multiplicării unui virus de către alt virus în timpul coinfecției aceleiași gazde prin competitivități : *a)* la nivelul receptorilor de atașare, unde virusul interferent distruge sau ocupă receptorii virusului interferat ; *b)* prin ocuparea complexelor enzimatice și de sinteză (polimerază, ribozomi celulari) de către virusul interferent. La virusul gripal s-a descris fenomenul de autointerferență în condiții de mare multiplicitate a infecției din care rezultă, prin pasaje seriate, virioni cu genom incomplet. Aceștia interferează cu virionii infecțioși și duc progresiv la inoculuri neviabile. Virionii defectivi în genom au pierdut mai ales moleculele mari de ARN, ceea ce sugerează că autointerferența este un rezultat al suprasolicitării ARN polimerazelor celulare cu matrițe ; matrițele mai lungi, fiind mai greu transcrise, pot rămîne ca fragmente moleculare. Rezultă astfel încapsidări de genomuri incomplete.

8.6.2. INTERACȚIUNI VIRUS — CELULĂ-GAZDĂ

Interacțiunile dintre virusuri și celule-gazdă constituie subiecte ale majorității capitolelor acestei cărți. De la efectele citopatice și citolitice, inhibiții metabolice, pînă la integrări de genom viral în citogenom, toate sînt interacțiuni sau relații virus — gazdă. Se vor menționa în contextul geneticii virusurilor doar despre recombinări genom viral — fragmente citogenomice preluate ca molecule-recombinant în virionul matur și despre efectele mutagene posibile exercitate de infecțiile virale asupra gazdei.

8.6.2.1. *Recombinări cu integrare de fragmente citogenomice în genomul viral*

Integrarea de fragmente de genom celular în genomul viral a fost observată de mult la bacterii în sistemul fag λ — *E. coli,* în care s-a observat că o întreagă regiune genetică posesoare a genelor care codifică enzimele de metabolizare a galactozei, regiunea *gal,* era recombinată cu genomul fagic (Jacob şi Wollman, 1959). Prin această recombinare genomul fagic pierdea un segment propriu, de aceea fagul respectiv a fost denumit λ *dg* gal^+ (adică defectiv în genom şi cu regiunea *gal*). S-a observat că şi dezoxiribovirusurile umane, în particular adenovirusul tip 12 (Ad12), au capacitatea să integreze în genomul lor fragmente citogenomice, chiar în timpul infecţiei productive. Loeffler (1982) menţionează că Ad12 care infectează productiv celule umane în cultură, de exemplu linia KB umană, produce un număr impresionant de molecule-recombinant/celulă infectată iar moleculele-recombinant sînt încapsidate în virionii maturi. Astfel de genomuri-recombinanţi sînt în număr de aproximativ 10^3/celulă infectată şi apar timpuriu, la 1—2 ore de la infecţie. Segmentele umane integrate în genomul viral sînt secvenţe repetitive adesea duplicate simetric într-o distribuţie palindromică de tipul :

↓
partea stîngă ——— AGCTTGCGCAAGCT ——— partea dreaptă
a genomului Ad TCGAACGCGAACGA a genomului Ad
↑

Segmentul repetitiv citogenomic este integrat în interiorul genomului, ca urmare este flancat de partea stîngă şi de partea dreaptă a genomului viral şi formează un recombinant molecular simetric, motiv pentru care a fost numit SYREC *(symmetric recombinant).* Virionii recombinanţi sînt stabili, dau infecţie productivă, sînt menţinuţi de mulţi ani prin pasaje seriate şi se sugerează că ar putea fi vectori de clonare genică la eucariote (Loeffler, 1982).

8.6.2.2. *Mutaţii citogenomice induse de infecţii virale*

În afara evenimentelor mutaţional-recombinante de la originea alterărilor drastice din transformarea malignă, infecţiile virale ar putea induce mutaţii ale unor gene care sînt implicate în expresii fenotipice nelegate de diviziune şi control, în gene producătoare de factori ai metabolismului intermediar. Astfel de schimbări nu ar fi surprinzătoare, deoarece oricare infecţie virală este concomitentă cu intricarea unui material genetic nou cu materialul genetic al celulei-gazdă. Pentru argumentarea acestei aserţiuni există cîteva observaţii la plante. De exemplu, Nottinger şi Dellaporta (1983) au obţinut mutaţii ale genei pentru alcooldehidrogenază *(Adh)* la *Zea mays* prin infectarea acestuia cu virusul mozaicului bandat al orzului. Alela *Adh* obținută era inactivă (nu mai producea alcooldehidrogenază) și a fost numită *Adh-in*. Izolarea alelei *Adh-in*, multiplicarea ei prin tehnologia ADN recombinant și determinarea secvenței de nucleotide (vezi subcapitolul 8.7) au demonstrat că mutația s-a datorat inserției unui segment mare de 3 pînă la 5 kb în interiorul genei *Adh*. Virusul utilizat, fiind un virus ARN, nu s-a sugerat inserția lui. Explicația efectului mutațional a constat în supoziția că infecția virală a indus un „stres citogenomic" care a mobilizat transpozoni capabili să se insereze aberant și să inducă mutații.

8.7. METODELE SECVENȚIERII DE ADN ȘI ARN, TEHNICILE DE HIBRIDIZARE CU SONDE DE ACID NUCLEIC ȘI CUNOAȘTEREA STRUCTURILOR INTIME ALE GENOMURILOR VIRALE. HĂRȚI GENETICE MOLECULARE

Cartografierea clasică prin recombinare și testele de complementare au fost completate în ultimii 10 ani prin metode moleculare de analiză a genomurilor virale, metode care au adus un spor considerabil de cunoaștere a intimității structurale atît a genelor, cît și a unora din mecanismele expresiei genice. Respectivele metode au ajuns chiar să devanseze raționamentul genetic potrivit căruia gena este descoperită și delimitată prin fenotipul ei. În prezent este dovedită posibilitatea de a cunoaște structura secvențială a unei gene aprioric corespondentului ei fenotipic și, mai mult, să se stabilească structuri genomice întregi la virusuri la care metodele clasice de recombinare au fost inaplicabile. Chiar în condițiile unei repetări, se impune cu necesitate descrierea de principiu a metodelor moleculare de analiză a genomurilor virale în acest context al geneticii virale, adică: secvențierea ADN și ARN; hibridizări moleculare de ARN — ADN *in vitro* și *in situ*.

8.7.1. SECVENȚIEREA ADN, SECVENȚIEREA ARN. HĂRȚI GENETICE MOLECULARE

Determinarea modului de succesiune a perechilor nucleotidice din constituția genelor alcătuite de ADN bicatenar sau din ADN monocatenar, cît și din ARN (în cazul virusurilor ARN), adică secvențierea acizilor nucleici, a fost rezultatul mai multor însușiri stabilite anterior.

1. Acizii nucleici sînt polianioni și migrează electroforetic cu rezultatele cele mai bune în geluri de agaroză. S-a putut stabili că același tip molecular, de exemplu cel liniar, are o viteză de migrare, în electroforeza

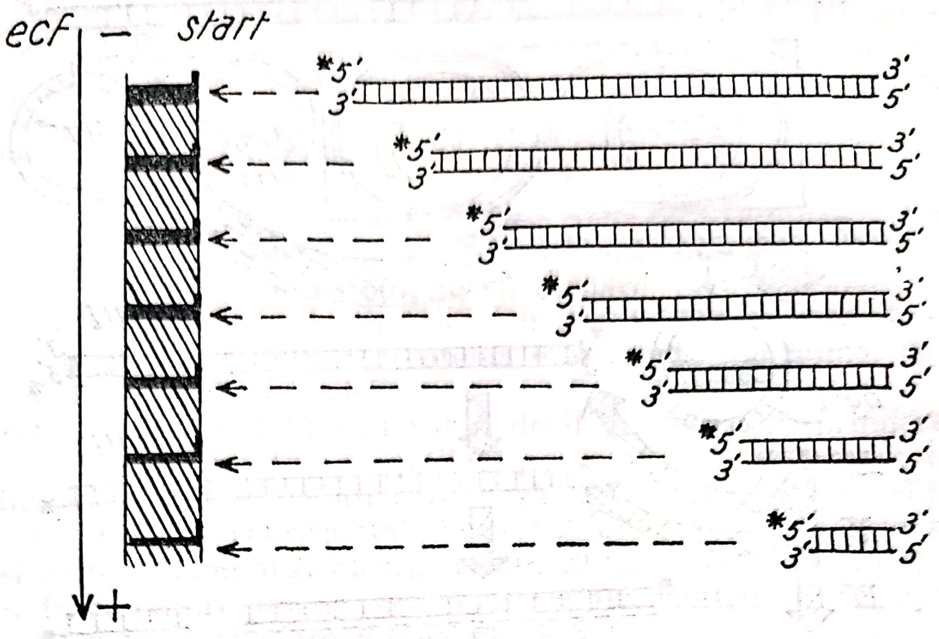


Fig. 8-11 — Distribuirea benzilor electroforetice *(ecf)* și lungimea moleculelor de ADN. (*Viteza* de migrare este invers proporțională cu lungimea moleculară.)
* — marcaj cu ^{32}P.

pe agaroză, invers proporțională cu mărimea moleculară. În cazul fragmentelor moleculare inegale aflate în amestec, migrarea electroforetică le separă în fracțiuni (fig. 8-11). Sensibilitatea de fracționare este foarte mare, încît diferențe de numai o pereche nucleotidică între un fragment și altul permit separarea lor în benzi distincte. Electroforeza și în geluri de poliacrilamidă dă o bună rezoluție. Relevarea fracțiunilor se obține fie prin marcarea prealabilă a acizilor nucleici cu izotopi radioactivi (^{32}P) și autoradiografie, fie prin colorarea cu bromură de etidium care este fluorescentă în ultraviolete și poate pune în evidență și fracțiuni chiar de 0,05 μg de ADN.

2. Un set de enzime cu specificități de situsuri de secvență permite fie identificarea de baze, fie fragmentarea unui genom în fragmente și subfragmente caracteristice, care permit orientări inițiale („pietre de marcaj") ale unei cartografieri moleculare ; fragmentele genomice care le produc sînt identificate electroforetic.

3. S-au descris o serie de reacții fizico-chimice cu specificitate pentru bazele purinice din nucleotidele ADN, care produc și subfragmentări ale fragmentelor obținute enzimatic iar aceste subfragmente sînt recunoscute electroforetic (Maxam și Gilbert, 1977 ; Gilbert, 1981). Respectivele reacții sînt descrise în continuare :

— Fragmente de ADN obținute prin enzime de restricție sînt marcate cu ^{32}P la terminalele 5′ ale fiecărei bicatene, cu ajutorul polinucleotidkinazei și ATP cu P radioactiv ; structura marcată la ambele extremități (fig. 8-12) este secționată în două fragmente inegale cu o altă en-

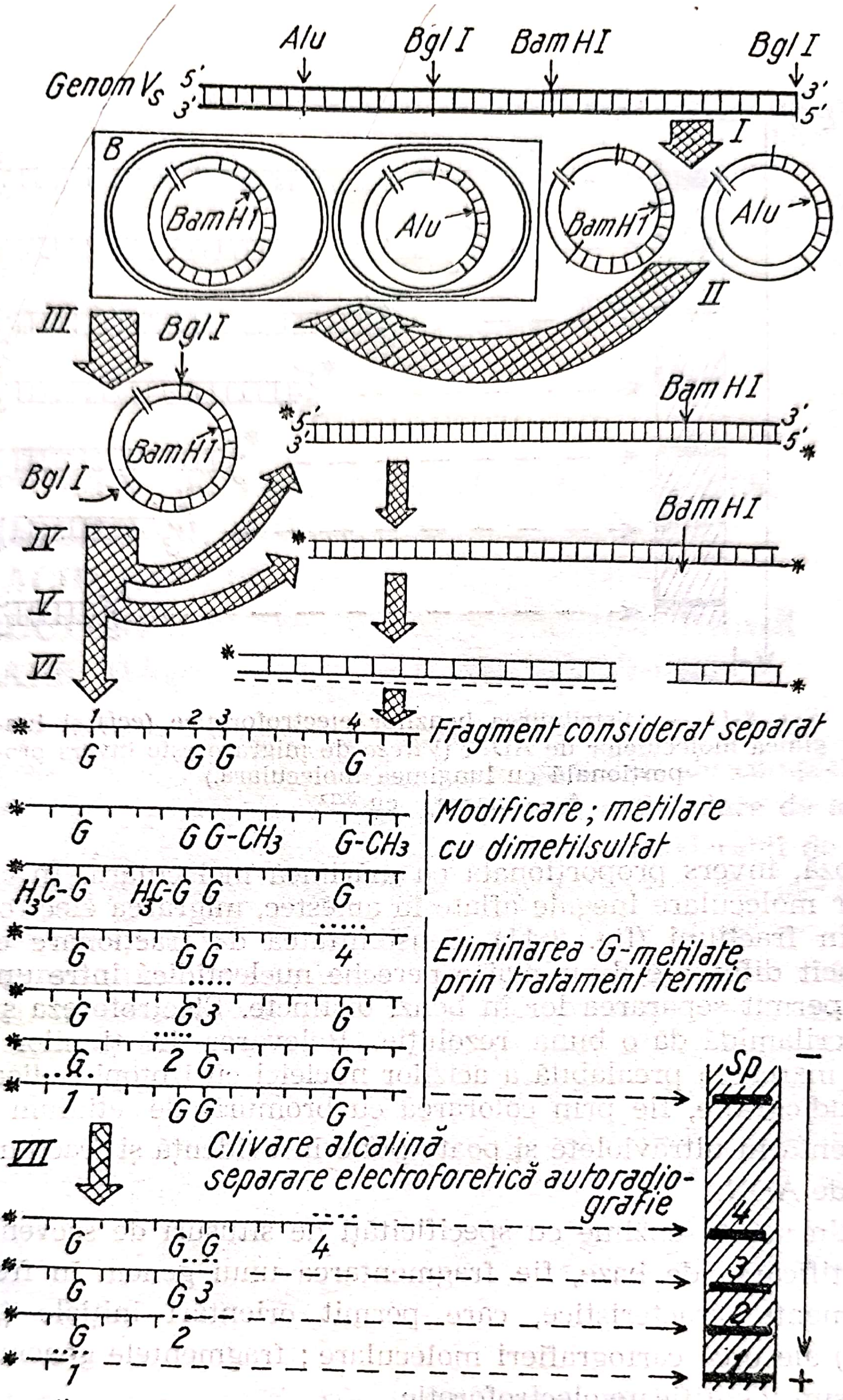

Alu
Bgl I
Bam HI
Bgl I
Genom V_S
5'
3'
3'
5'
I
B
Bam HI
Alu
Bam HI
Alu
II
III
Bgl I
Bam HI
Bgl I
*5'
3
Bam HI
3'
5*
IV
*
Bam HI
*
V
VI
*
*
1
2 3
4
*
G
G G
G
Fragment considerat separat
*
G
G G-CH_3
G-CH_3
Modificare; metilare cu dimetilsulfat
*
H_3C-G
H_3C-G G
G
*
G
G G
4
Eliminarea G-metilate prin tratament termic
*
G
G 3
G
*
G
2 G
G
*
1
G G
G
VII
Clivare alcalină separare electroforetică autoradiografie
Sp
−
*
G
G G
4
*
G
G 3
*
G
2
*
1
4
3
2
1
+

Fig. 8-12 — Secvenţierea unui genom de dezoxiribovirus format dintr-o moleculă liniară bicatenară de ADN.

Stabilirea spectrului de situsuri pentru endonucleazele de restricţie pe genomul viral : *Alu* — enzima din *Arthrobacter luteus* ; *Bgl*I — enzima din *Bacillus globigii* ; *Bam* HI — enzima din *Bacillus amyloliquefactens* ; -→ indicatoare pentru situs de clivaj ; ⇩ — etape din secvenţiere ; *I* — secţionarea genomului cu *Bgl*I şi încorporarea celor două segmente cu situsuri *Bam* HI, respectiv *Alu*, în vectori ; *II* — endocitare prin transformare genetică în celule separate de *E. coli* şi formarea „bibliotecii genice" corespunzătoare genomului V ; *III* — izolare şi purificare de ADN-vector consecutive multiplicării bacteriei purtătoare ; secţionarea segmentului *Bam* HI cu enzima *BglI* şi separarea ultracentrifugală sau electroforetică ; *IV* — tratarea cu polinucleotidkinază şi $AT^{32}P$ pentru marcare a capetelor 5' ; *V* — secţionare cu *Bam* HI şi separarea segmentului mare sub formă de fracţie ultracentrifugală sau electroforetică ; [rezultă marcajul radioactiv numai la un capăt (*) şi numai al unei catene, resturile ei neobservîndu-se în tratările ulterioare] ; *VI* — luarea în consideraţie numai a fragmentului marcat, pentru explicaţia prelucrărilor ulterioare ; *VII* — dispunerea electroforetică a benzilor după prelucrări ; *1, 2, 3, 4* — identificarea celor patru guanine *(G)* prin benzi electroforetice corespunzătoare puse în evidenţă prin autoradiografie (------→) −↑ + reprezintă sensul de migrare electroforetică ; *Sp* — poziţia segmentului iniţial în electroforeză.

zimă de restricție; fragmentele respective separate devin cu un singur capăt marcat cu ^{32}P iar acesta constituie capătul de referință în reacțiile ulterioare, deoarece este singurul relevant în testele electroforetice. Tratamentul alcalin desface fragmentul bicatenar într-o catenă marcată observabilă electroforetic, iar cealaltă nu este observabilă și deci nu contează.

— Se metilează G și A din fragmentul ADN de examinat cu ajutorul dimetilsulfatului ; reacția are însușirea să inducă bazei metilate instabilitate termică în legarea de catenă și, ca urmare, prin tratament termic, G-metilată și A-metilată sînt eliminate ; în locul fiecărei baze rămîne un gol apurinic la care continuitatea catenei este menținută numai de restul dezoxiribozic legat fosfodiesteric.

— Deși G este metilată mai rapid decît A, totuși desprinderea termică este mai rapidă pentru A-metilată ; prin timpul de tratare termică de depurinizare se poate stabili care bază din cele două este eliminată.

— Golul apurinic reprezentat de restul glucidic este foarte sensibil la alcali și prin tratamentul alcalin restul glucidic este eliminat, producîndu-se o fragmentare nouă, caracteristică fie pentru A, fie pentru G și recunoscută prin electroforeză (vezi fig. 8-12).

— Spectrul electroforetic al fragmentelor care diferă numai printr-o bază este net și astfel, lucrîndu-se cu recontroluri, se pot identifica fragmentele corespunzătoare fie guaninei, fie adeninei.

— Efectuîndu-se șirul de reacții și analize de mai sus, la ambele catene separate din fragmentul bicatenar de examinat, se ajunge la cunoașterea succesiunii purinelor pe cele două catene complementare și, conform împerecherilor Watson-Crick, dintre cele două catene (A numai cu T și G numai cu C) se poate stabili în principiu secvența completă.

4. Grupul de cercetare al lui Gilbert, pentru a se sprijini numai pe fapte și pentru un control mai riguros al secvențierii prin purine, a pus la punct reacții specifice de depirimidinizare și fragmentări la nivelul C și T, cît și perfecționări în distincția mai netă a celor două depurinizări A față de G (pentru amănunte, vezi Gilbert, 1981 și referințele lucrării). Autorii au comunicat generos metoda, înainte de publicare, la oricine a fost interesat și, astfel, în 1978 apare o explozie de secvențieri complete de gene la bacterii, secvențierea completă a plasmidei pBR322 (Sutcliffe, 1978) și secvențierea completă a genomului de SV40 de către două grupe de autori (Fiers și colab., 1978 ; Reddy și colab., 1978) (fig. 8-13).

Precedînd pe Gilbert și colaboratorii săi, Sanger și Coulson (1975) au pus la punct o altă metodă de secvențiere cu ajutorul unei exonucleaze din veninul șarpelui *Crotalus adamanteus*, cu specificitatea că hidrolizează structuri monocatenare fie de ARN, fie de ADN, numai cîte un nucleotid pentru un moment reacțional și numai la extremitatea 3′-OH. Prin autoradiografia mai multor specimene hidrolitice, analizate sofisticat prin electroforeză și cromatografie de tip bidimensional controlate prin analize segmentare de replicare *in vitro*, Sanger și colab. (1977) au reușit să secvențieze întregul genom al fagului φX174. Deși valabilă și pentru secvențierea ARN, metoda lui Sanger, impresionantă prin eleganța și complexitatea ei, este incomparabil mai deficilă decît cea precizată de școala lui Gilbert. O dovadă neechivocă în acest sens constă din faptul că, în prezent, pentru secvențierea unui ARN se preferă întîi

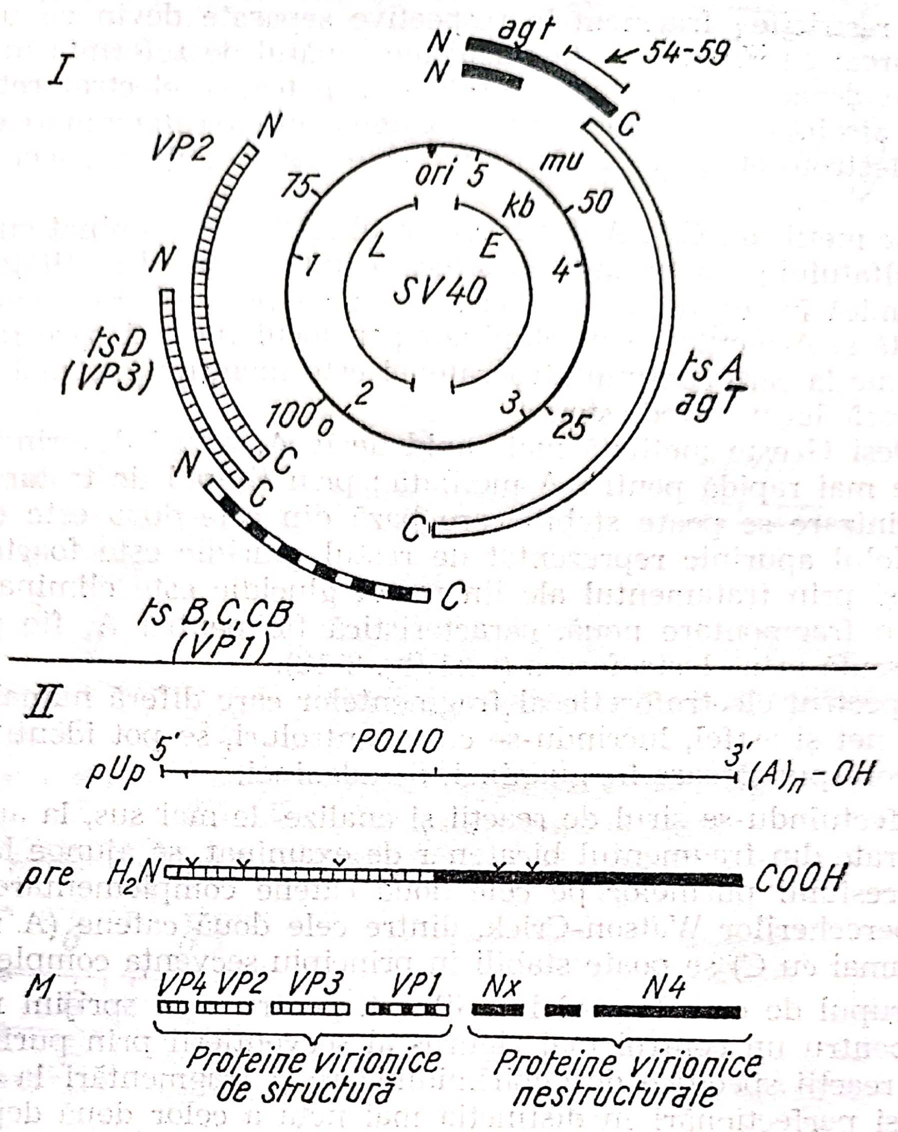

I
N
agt
N
54-59
C
VP2
N
ori
5
mu
75
kb
50
N
L
E
1
4
SV40
tsD
(VP3)
tsA
agT
100
0
2
3
25
C
N
C
C
C
ts B,C,CB
(VP1)
II
pUp
5′
POLIO
3′
(A)n-OH
pre
H2N
COOH
M
VP4
VP2
VP3
VP1
Nx
N4
Proteine virionice de structură
Proteine virionice nestructurale

Fig. 8-13 — Exemple de hărţi genetice virale pe baza analizei recombinaţionale a mutanţilor *ts*, secvenţierii de baze şi analizei proteinelor (după Levine, 1982; Luria şi colab., 1978).

I — harta genetică a virusului simian 40 de 5,2 kb; *tsA, B, C, CB* şi *D* — grupe de mutanţi *ts* stabilite prin teste de complementare şi corespunzătoare la diferite proteine; *agT* (□) — antigenul T major; *agt* (■) — antigenul t minor; porţiunea 54—59 — porţiune neacoperită de mutanţii *tsA* şi suprapusă, pentru ambele antigene t şi T; *VP1* (■ ■ ■), *VP3* şi *VP2* (▭) — proteine virionale din componenţa capsidei; *L* — porţiunea din genom corespondentă proteinelor tîrzii (cf. engl. *late*); *E* — porţiunea corespondentă proteinelor timpurii (cf. engl. *early*); *ori* — originea replicării; *II* — harta genetică a virusului polio precizată şi prin secvenţierea ADN complementar obţinut prin reverstranscriere; *pUp* — nucleotidul uridilic fosforilat la 5′ constituie extremitatea 5′ a moleculei genomice de ARN; *3′-(A)n-OH* — coada poliadenilică (vezi şi fig. 8-18) (genomului ARN nu-i este ataşată şi o formaţie „cap“ 7-metilguaninică); *pre* — precursor macropolipeptidic clivat la situsuri particulare de o protează în proteine mature *(M)*; *Nx*, N4. — proteine vironice nestructurale.

sinteza unui ADN complementar (ADNc) prin reverstranscriere cu o retranscriptază, urmată de secvențierea ADNc de tip Gilbert. Prin deducția complementarității de împerechere se stabilește în final secvența moleculei de ARN aflată în lucru. În contextul de față, metoda Sanger este amintită pentru valoarea ei prioritară.

În numeroase cazuri de secvențiere, în care cantitatea necesară de fragmente genomice este mare, s-a recurs la obținerea inițială de cantități mici de ADN izolat din virionii purificați ; acesta a fost fragmentat cu endonucleaze de restricție, fragmentele au fost apoi încorporate în vectori prin tehnica ADN recombinant și apoi multiplicate clonat în tulpini bacteriene, obținîndu-se o „bibliotecă genică“ pentru un virus animal dat. Fiecare tulpină bacteriană amplificatoare a unui fragment a furnizat cantitatea suficientă pentru secvențierea de tip Gilbert.

Pentru ribovirusuri, genomurile ARN sînt întîi retrotranscrise în ADN complementar monocatenar. Acesta este apoi bicatenarizat prin replicare *in vitro* și clonat în bacterii pentru amplificarea cantitativă. Moleculele de ADN complementar izolate și purificate sînt în continuare secvențiate prin tehnica Gilbert iar genomul ARN este evaluat ca secvențiere completă prin raționamentul împerecherii complementare Watson-Crick, în conformitate cu schema :

secvența ADNc 3′-AACGCTAAGGTCCATA...

secvența ARN viral 5′-UUGCGAUUCCAGGUAU...

Metoda secvențierii, aplicată la virusuri ale căror hărți genetice erau apreciate prin metodele clasice ale recombinării mutanților *ts* și *hd*, a dus la confirmări și evaluări mai intime ale hărților clasice, la precizări deosebite în privința modalității de expresie genică. Aportul cel mai impresionant pentru patologia umană adus de clonarea prin tehnologia ADN recombinat și secvențiere a constat din cunoașterea structurii moleculare a genomurilor aparținînd unor virusuri inaccesibile analizei prin metodica recombinărilor clasice. Exemple de referință sînt virusurile hepatitei A și mai ales virusul hepatitei B, de importanță prioritară în profilul prezent al infecțiilor virale umane. Prin clonarea ADNc al genomului ARN al HAV și secvențiere, Tivehurst și colab. (1983), Najarian și colab. (1985) au demonstrat că, deși structura genomică generală este asemănătoare celei găsite la picornavirusuri, totuși sînt diferențe remarcabile în secvența nucleotidică a genelor de ARN polimerază și de proteine capsidice. Așa se explică rezistența termică mai mare a HAV față de celelalte enterovirusuri, cît și faptul că replicarea HAV nu este blocată de guanidină, HBB și arildonă (Lemon, 1985), agenți care inhibă replicarea virusului polio (reprezentantul de seamă al picornavirusurilor). În privința structurii genomice a HBV, imposibilitatea creșterii pe culturi celulare și paucitatea gazdelor de laborator au făcut ca, pînă la clonarea moleculară, să se cunoască doar faptul că este un virus ADN. Cînd clonarea prin tehnica ADN recombinant a scăpat de interdicțiile impuse pe motive de bioetică și de pericolul biohazardului (Shafritz, 1984), dintr-odată șase grupe de autori au raportat, în 1979, structura genomului HBV (fig. 8-14). Oricum, secvențierea în sine, necesară pentru cunoașterea geneticii virale, nu este suficientă dacă nu este corelată cu funcțiile virale sau cu fenotipul viral. Tehnicile de hibridizare cu acizi nucleici marcați radio-

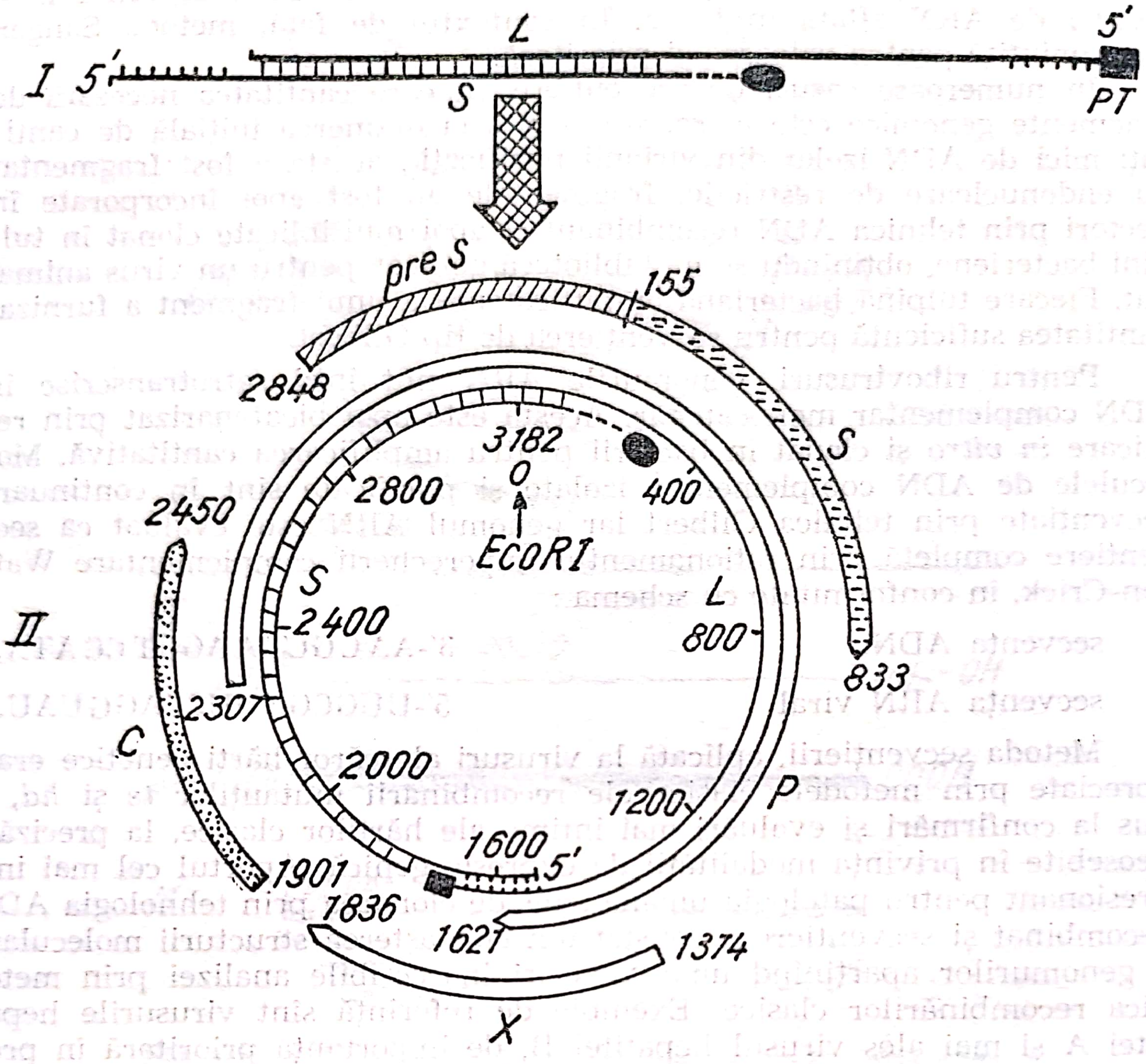


Fig. 8-14 — Exemplu de genom viral cu structură cunoscută numai grație clonărilor de manipulare genică și secvențierii (vezi și fig. 8-12). Harta genomului HBV (după Tiollais, 1981 ; Vyas și Blum, 1984 — cu simplificări) : *I* — genomul ADN-HBV extins, subliniindu-se extremitățile adezive ; porțiunea bicatenară și cea monocatenară realizate de cele două catene, lungă *(L)* și scurtă *(S)* ; *PT* (■) — proteina terminală 5′ inițiatoare ; ● — polimeraza asociată genomului ; *II* — starea circulară a genomului închisă necovalent prin împerecheri Watson-Crick între extremitățile adezive ; *S* genă HBs pentru antigenul de suprafață ; *pre S* — porțiune precursoare eliminată prin prelucrare proteinică ; [Punctul O al hărții și nucleotidul 3 182 sînt marcate de singurul situs de acțiune al endonucleazei de restricție *Eco* RI (de la *E. coli* R) ; de la acesta s-a început secvențierea !] ; *C* — porțiunea corespunzătoare antigenului HBc ; *P* — porțiune mai lungă (aproximativ trei sferturi din genom care corespunde unei proteine de 90 kilodaltoni, probabil polimeraza ; *X* — porțiune mai scurtă corespunzătoare unei secvențe *ORF* fără corespondență proteinică. (Cifrele săgeților indică numărul nucleotidelor din genom la care corespund ; de remarcat suprapunerea genelor și implicit a transcrierilor corespunzătoare.)

activ, folosiţi ca sonde de testare a corespondenţei gene — ARN, şi secvenţierea aminoacizilor din proteine au furnizat împreună cu secvenţa genomului date surprinzătoare, ca suprapuneri de gene, transcrieri pe ambele catene de ADN, segmente codonice care nu au corespondenţă aminoacidică identificată de fenotip.

8.7.2. TEHNICI DE HIBRIDIZARE ARN — ADN. TEHNICILE SOUTHERN ŞI NORTHERN CU ACIZI NUCLEICI MARCAŢI RADIOACTIV CA SONDE

Hibridizările de acid nucleic constau din unirea a două fragmente monocatenare de acid nucleic în structuri bicatenare stabile în condiţii adecvate de temperatură, concentraţie ionică şi pH. Hibridizarea este condiţionată de complementaritatea secvenţelor de baze dintre cele două catene în observaţie şi, atunci cînd are loc, denotă omologia de împerechere. Punerea în evidenţă a omologiei prin hibridizări indică fie provenienţa lor din aceeaşi moleculă bicatenară, fie provenienţa de la organisme cu înrudiri evoluţioniste, fie existenţa de interrelaţii de matriţă în sinteza lor. Pentru ilustrare, se dau următoarele reacţii de hibridizare:

$$\text{ADN } 5' — \text{ATCTGA} — 3' \quad \rightarrow \quad \begin{array}{l} 5' — \text{ATCTGA} — 3' \\ 3' — \text{UAGACU} — 5' \end{array} \qquad (1)$$

$$\begin{array}{l} \text{ARN } 3' — \text{UAGACU} — 5' \\ \text{ARN } 3' — \text{GCACUC} — 5' \text{ nehibridizare} \end{array} \qquad (2)$$

În reacţia (1) are loc hibridizare datorită secvenţei complementare iar în reacţia (2) nu se produce hibridizare, prin absenţa complementarităţii Watson-Crick dintre ADN şi ARN.

Hibridizările testate pot fi ADN — ADN sau ARN — ADN. Pentru observarea lor, unul din fragmentele partenere este marcat cu ^{32}P sau cu tritium, astfel: cu polinucleotidkinază, ca în reacţia de secvenţiere; încorporare de ribunocleotide tritiate sau cu ^{32}P în molecule de ARN prin transcriere *in vitro* sau transcriere *in vivo* (culturi de celule infectate cu virusuri în prezenţă de nucleotide marcate, din care se purifică ARN marcat); încorporare de dezoxiribonucleotide marcate în ADN fie prin replicare *in vitro* sau *in vivo*, fie prin retrotranscriere. Catenele marcate radioactiv poartă numele de sonde ARN sau ADN (*RNA probes, DNA probes*). Există două mari categorii de hibridizări: *a)* hibridizarea *in situ*, cînd preparate cromozomiale sînt tratate cu soluţii de molecule-sonde, incubate suficient, spălate, acoperite cu o peliculă de emulsie fotografică şi incubate la întuneric şi la rece un timp necesar impresionării emulsiei prin emanaţiile radioactive, apoi observate pentru regiunile de hibridizare manifestate prin puncte negre (autoradiografie *in situ*) vizibile la microscop; *b)* hibridizarea *in vitro*, bazată tot pe autoradiografie, dar combinată cu electroforeză şi perfecţionată de Southern (1975).

Metoda Southern de testare a fragmentelor de ADN cu sonda ARN (Southern blotting) (fig. 8-15). Fragmente de ADN viral obţinute tipizat prin tratament cu enzime de restricţie sînt supuse electroforezei în gel de agaroză sau gel de poliacrilamidă. Gelul cu fracţiunile de ADN este

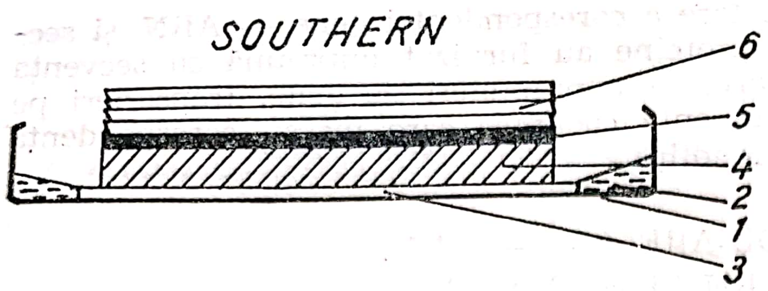


Fig. 8-15 — Ilustrarea tehnicii de hibridizare Southern (după Old și Primrose, 1980). *1* — placă; *2* — tampon; *3* — foaie de hîrtie de filtru umedă; *4* — gel cu ADN electroforezat; *5* — foaie de nitroceluloză; *6* — foi de hîrtie de filtru uscată (explicații în text).

tratat alcalin pentru denaturarea (desfacerea monocatenară) fragmentelor și apoi așezat pe suprafața unei hîrtii de filtru saturată cu tampon. Deasupra gelului se culcă o foaie de filtru de nitroceluloză, acoperită la rîndul ei cu patru—cinci foi uscate de hîrtie de filtru. După un timp de incubație necesar difuziunii, fragmentele de ADN difuzează în foaia de nitroceluloză unde se fixează datorită marii afinități dintre ADN și nitroceluloză; distribuția de benzi se păstrează. Fragmentele de ADN legate de nitroceluloză sînt hibridizate cu sonde ARN și/sau ADN iar hibrizii sînt detectați prin autoradiografie.

Tehnica „Northern" de hibridizare (Alwine și colab., 1977). Este numită în „argoul științific" „Northern" deoarece este complementară tehnicii Southern și constă din transferul benzilor de ARN din gelul de agaroză într-o foaie de hîrtie de filtru reactivată chimic pentru a lega covalent fracțiunile de ARN. ARN nu se leagă suficient de puternic de foile de nitroceluloză. Ca și în tehnica Southern, foile reactivate chimic și cu fracțiunile ARN fixate sînt hibridizate cu sonde (acum ADN) și hibrizii eventual formați sînt testați prin autoradiografie. Hîrtia de filtru de tip „Northern" s-a dovedit a avea afinitate și pentru ADN denaturat, fragmentele mici de ADN fiind mai eficient fixate decît în nitroceluloză și, ca urmare, uneori este de preferat chiar tehnicii Southern (Old și Primrose, 1980).

Anterior acestor tehnici, s-au utilizat pe aceleași principii metode mai laborioase de eluție a fragmentelor de ADN, fixarea de discuri separate de nitroceluloză și apoi hibridizarea.

Secvențierile genomice, implicit hibridizările cu sonde ARN și ADN, au dus la numeroase precizări privind structuri și funcții ale genomurilor virale, incomplet sau imposibil de relevat prin recombinările clasice.

8.8. APORTURILE SECVENȚIERILOR, CLONĂRILOR ȘI HIBRIDIZĂRILOR MOLECULARE GENETICE ÎN PRECIZAREA MECANISMELOR EXPRESIEI GENICE VIRALE

Principiul central al geneticii moleculare poate fi ilustrat pragmatic prin faptul că genele produc proteine prin intermediul „fabricării" de ARN. Secvențierea genomurilor îmbinată cu hibridizări ARN-ADN și cu secvențierea aminoacizilor în proteină au adus aporturi deosebite în cunoașterea mecanismelor prin care genele virusurilor ADN produc proteine prin intermediul fabricării ARN sau genomurile ARN produc proteine în cazul virusurilor ARN. Această relație de „producție“, care cuprinde reacțiile complexe de transcriere a secvenței de ADN în secvențe de ARN și de traducere a secvențelor nucleotidice din ARN în secvențe aminoacidice din proteine, mai este numită și expresie genică.

8.8.1. UN REZUMAT AL EXPRESIEI GENICE GENERALE ȘI AL REPLICĂRII, CA REFERINȚĂ PENTRU CARACTERISTICI OBSERVATE LA VIRUSURI

Producerea de ADN, ARN și proteine, prin care se asigură ereditatea, respectiv expresia genică a fenotipului, se derulează prin reacții complexe separate, replicarea, transcrierea respectiv traducerea. Toate aceste reacții au mai multe caractere comune, descrise în continuare: *a)* au loc în prezența de molecule preformate cu rol de matriță, care le impun specificitate structurală, motiv pentru care sînt numite *reacții dependente de matrițe. b)* Fiecare reacție se petrece într-o unitate de matriță, delimitată structural și funcțional; unitatea de replicare se numește *replicon,* unitatea de transcriere este delimitată de lungimea corespunzătoare a produsului (molecula de ARN), unitatea de traducere constă din segmentul traductibil (codonic) din ARNm corespunzător la aminoacizii din lanțul polipeptidic specific. *c)* Fiecare reacție are trei etape — de inițiere, de elongație (de alungire progresivă) și de terminare — precedate *in vivo* de sinteza precursorilor și activarea lor: sinteza de dezoxiribonucleotide și ribonucleotide activate în forma de nucleotide trifosforice, sinteza de aminoacizi activați în forma de aminoacil-AMP. *d)* Inițierea și terminarea au segmente în molecula-matriță, denumite generic ca segmente-„semnal“ sau *semnale de inițiere* și de *terminare.* Semnalele sînt situsuri de recunoaștere pentru complexele de factori enzimatici care efectuează reacția. *e)* Oricare reacție se derulează prin încorporare progresivă, precursor cu precursor, petrecîndu-se decurgător pe matriță, de la inițiere spre terminare. De aceea, în descrierea unui segment dat din unitatea de matriță și a relațiilor acelei structuri cu segmentele vecine, termenii se referă la această curgere reacțională *(stream)* și se indică segmentele situate în sens contrar curgerii — segmente *amonte (up stream segments)* — iar cele distribuite dincolo de segmentul implicat — segmente *aval (down stream)* (fig. 8-16). *f)* Deoarece reacțiile sînt polimerizări de precursori (cf. gr. *meros* = parte; *polymeros* = mai multe părți unite), atunci enzimele care unesc precursorii prin legături covalente se numesc *polimeraze.* Cum polimerazele sînt condiționate în activitatea lor de matrițe, sînt denumite fie cu un termen împrumutat de la numele reacției, fie cu un termen care indică produsul reacției și matrița. Polimerazele de replicare ale ADN sînt numite ADN polimeraze dependente de ADN, polimerazele de transcriere — ARN polimeraze dependente de ADN sau transcriptaze —, polimerazele de retrotranscriere (sinteza de ADN pe ma-

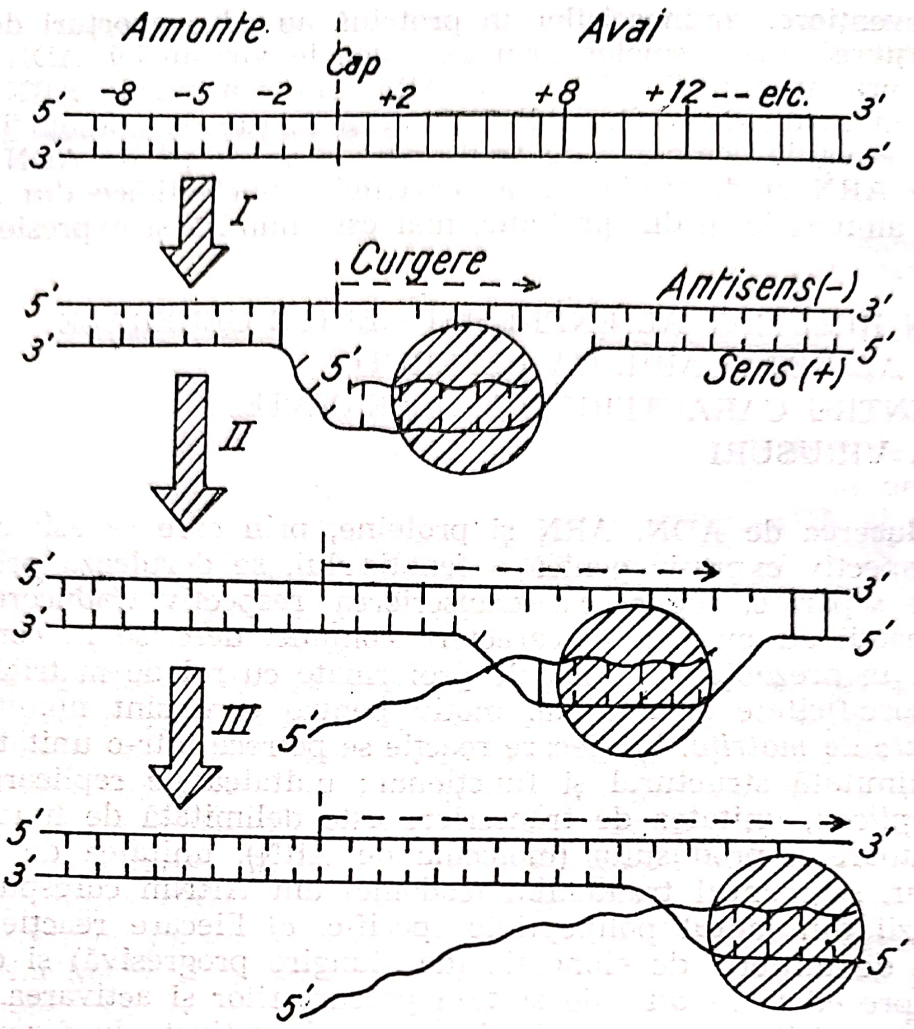


Fig. 8-16 — Transcrierea pe o singură catenă de ADN din structura duplex și raportarea poziției de segmente și nucleotide cu sensul de derulare a transcrierii față de un punct de referință.

∼∼∼ — ARN născînd ; *cap* — nucleotidul din ADN corespunzător nucleotidului 5′ extrem din ARN, luat ca punct de referință în această schemă ; ---⟩ — sensul de derulare, de „curgere“ a transcrierii *(stream)*; *amonte (up stream)* — nucleotide și/sau segmente notate cu minus mai sus de punctul de referință ; *aval (down stream)* — nucleotide și/sau segmente notate cu plus ; *antisens (—)* — catena netranscrisă din duplexul ADN ; *sens* (+) — catena transcrisă ; *I, II, III* — diferite etape ale transcrierii ; ▨ — complexul enzimatic de transcriere (transcriptaza).

triță ARN) sînt numite ADN polimeraze dependente de ARN sau reverstranscriptaze. *g)* Transcrierea, în general, are ca matriță numai o catenă din cele două ale dublu-helixului ADN, numită catena-sens sau pozitivă (+) *(positive strand)* și pentru fiecare ARN este un segment de ADN care nu se suprapune cu un alt segment de transcriere. *h)* La eucariote și om, fiecare lanț polipeptidic matur corespunde unei molecule de ARNm, la rîndul ei corespunzătoare unei gene.

În raport cu aceste precizări standard, la virusuri au fost descrise aspecte moleculare ale expresiei genice, din care unele s-au dovedit apoi a fi prezente și la celulele-gazdă ; de exemplu : structura discontinuă a genelor (exono-intronică), retrotranscrierea celulară, segmente de origine (de inițiere) a replicării. Alte aspecte nu au fost observate pînă în prezent decît la virusuri și le vom descrie în continuare.

8.8.2. SEGMENTELE DE INIȚIERE A REPLICĂRII ADN — ORI — ȘI PROTEINE INIȚIATOARE LEGATE GENOMULUI. REPLICAREA DE ARN LA RIBOVIRUSURI

La genomurile bacteriofagilor, apoi și la genomurile unor virusuri animale, s-au descris segmente particulare de inițiere a replicării, denumite situsuri de *origine* ale replicării sau *ori*. Acestea au fost apoi sugerate ca prezente și în structurile cromozomiale ale citogenomurilor, segmentele *ori* fiind considerate ca *semnale* centrale ale repliconilor. Segmentele *ori* sînt recunoscute de proteinele care disociază primar structura bicatenară în buclă monocatenară, la care se leagă proteinele SSBP *(Single Strand Binding Proteins)*, pregătindu-se astfel matrița de interacțiune a ADN polimerazei de replicare (fig. 8-17).

La unele virusuri cu genom liniar nu s-au găsit segmente *ori* iar inițierea replicării este asigurată de o proteină legată covalent la capătul 5′ al moleculei genomice. Astfel de situații au fost demonstrate la virusuri ADN, ca parvovirusul H1, virusul hepatitei B, adenovirusuri și la fagul φ 29 de *Bacillus subtilis ;* proteine-„extremă" de legare covalentă la terminalul 5′ al genomului ARN au fost observate și la ribovirusurile polio, encefalomiocarditei și la unele virusuri ale plantelor. S-au descris și mutanți *ts*, în care este interesată proteina de inițiere a replicării. La virusurile ADN cu genom bicatenar, proteina inițiatoare se află la ambele capete (de exemplu, la adenovirusuri) iar replicarea se desfășoară în două runde inițiate succesiv pentru fiecare catenă (vezi fig. 8-17).

Replicarea ARN la animale este, pînă în prezent, o caracteristică a ribovirsurilor. Fiecare genom ARN are o genă care codifică polimeraza specifică. La plante s-au descris însă și ARN polimeraze celulare (Robertson, 1983), capabile să asigure multiplicarea viroizilor și virusoizilor.

8.8.3. TIPURI DE TRANSCRIERI STÎNGA — DREAPTA GENE SUPRAPUSE. PROMOTORI, TERMINATORI, SEGMENTE ORF ȘI ACTIVATORI

Secvențierea genomică de tip Gilbert la virusurile ADN și, în particular, la adenovirusuri, virusuri herpetice și hepadnavirusuri (ale hepatitelor B), îmbinate cu hibridizări ARN — ADN de tip Southern — Nort-

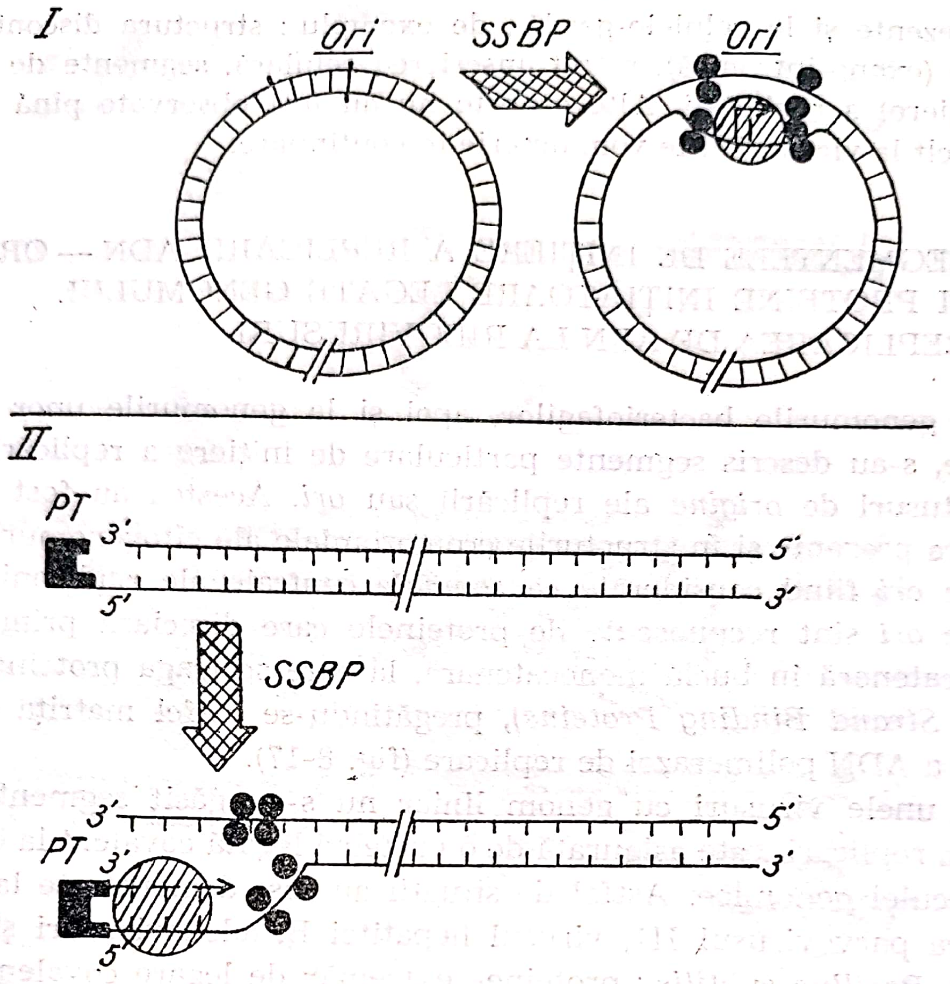


Fig. 8-17 — Segmente de inițierea a replicării la virusuri cu genom ADN.

I — segmentul de origine *(ori)* a inițierii în replicare este sediul unei disocieri a catenelor care sînt menținute în starea monocatenară de proteine de legare *(SSBP)* la ADN monocatenar (● ● ●); *II* — inițierea prin proteina terminală *(PT)* „în potcoavă“: ◍ — complexul polimerazei de replicare, denumit și replisom. (Respectivele structuri realizate la nivelul segmentelor de inițiere sînt recunoscute de polimeraza de replicare și permit inițierea replicării.)

hern, au putut preciza mai multe aspecte ale transcrierilor. În primul rînd că transcrierea poate avea loc pe ambele catene în direcția de stînga și de dreapta, așa cum s-a demonstrat inițial la bacteriofagi și în particular la fagul λ. Astfel de transcrieri stînga — dreapta au fost observate și amplu studiate la adenovirusuri (fig. 8-18). Moloculele de ARNm rezultate din transcrierea genomurilor ADN de la virusurile animale au prelucrări asemănătoare precursorilor de ARNm ai celulelor-gazdă. Extremitatea 5′ a ARNm este capușonată cu o grupare 7-metilguanozin-5′-trifosfat (7mG) iar extremitatea 3′ este dotată cu o „coadă“ poliadenilică prin acțiunea unei enzime specifice, poliA-polimeraza, care adaugă resturi adenilice preluate din ATP pînă cînd se formează o secvență poliA de 100 pînă la 200 de adenili (fig. 8-19). Nucleotidele pentru capușonare 7mG și pentru inserția „cozii“ adenilice sînt numite *situs „cap“*, respectiv *situs de inserție*, și sînt luate în secvența genei corespunzătoare ca puncte de referință față de care s-au descris secvențe-„semnal“, de importanță deosebită în reglarea transcrierii. Dacă se consideră nucleotidul genomic corespunzător situsului „cap“ ca punct de referință coroborat cu sensul de „curgere“ a transcrierii *(stream)*, atunci nucleotidele amonte *(up stream)* se notează cu minus iar nucleotidele aval *(down stream)* cu plus. Astfel, la genele transcriptibile, codonul ADN-TAC — corespunzător

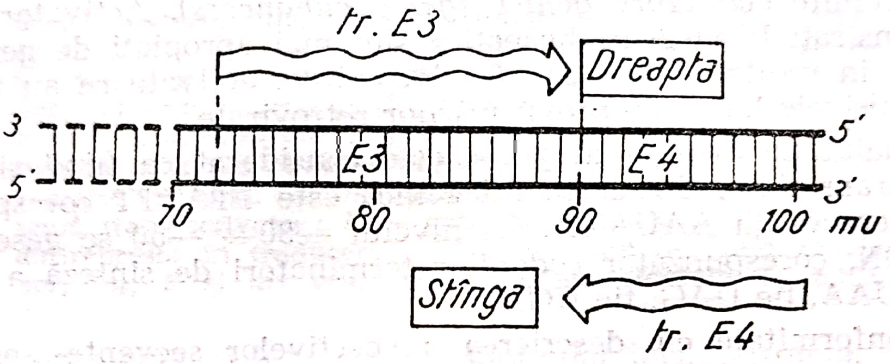


Fig. 8-18 — Transcriere în ambele direcții pe cele două catene ale ADN viral la un fragment genomic de adenovirus. *E3, E4* — gene virale cartografiate prin mutanți *ts* între unitățile de cartografiere *(mu)* 70—100 ; *tr.E3, tr.E4* — ARN transcris înspre dreapta, respectiv înspre stînga.

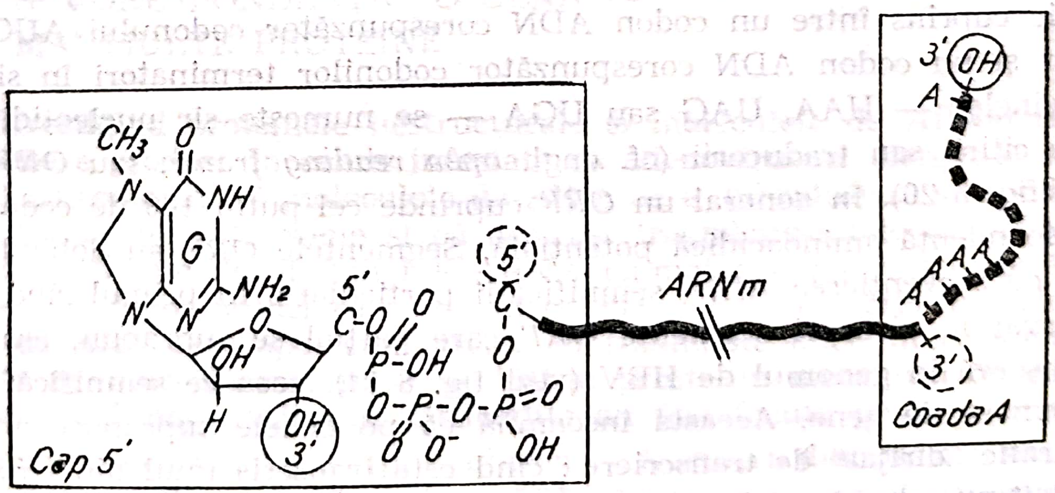


Fig. 8-19 — Prelucrarea extremităților de ARN viral transcris pe genomul dezoxiribovirusurilor.
Moleculele transcrise de ARNm, necesare sintezei proteinelor virale, sînt aprioric prelucrate prin adăugarea la extremitatea 5' *(cap 5')* a structurii 7-metilguanozin-5'-trifosfat și a unei „cozi“ poliadenilice *(coada A)* de 100—200 de resturi adenilice ; cele două structuri cap 5' și coada A 3', sînt necesare pentru stabilitatea ARNm, cît și pentru inițierea, respectiv pentru terminarea sintezei proteinelor.

codonului ARN-AUG —, inițiator al sintezei proteice, se află în poziția +25—+28 sau +30—+33. Amonte de situsul „cap“ între —25 și —35 nucleotide s-a demonstrat prezența de segmente de tip promotor identificate mai întîi în sistemul fag-bacterie de către Pribnow (1975) ca secvența TATAA sau secvențe asemănătoare acesteia. La adenovirusuri, Fujinaga și colab. (1984) au găsit pentru genele E1A, E1B, promotori de tipul TATTA sau TATTT și TATAA. Studii efectuate la genomurile SV40, polyoma și herpesvirusuri (gena pentru timidilatkinază) au demonstrat că mai în amonte, la nivelul de —107— —178 și —179— —250, se găsesc repetitive de 50—70 de perechi nucleotidice cu rolul de a activa transcrierea inițială la situsul „cap“. Aceste repetitive legate prin tehnici speciale la o genă eucariotă, cum ar fi gena beta-hemoglobinică, au ca efect, după legare, o creștere a transcrierii. Respectivele repetitive au fost numite *activatori genici (gene enhancers)*. Activatori de acest tip demonstrați la virusuri herpetice sînt mai apropiați de gena timidilatkinază, în poziția —109 și —95. Repetitive activatoare au fost găsite și în repetitivele lungi ale provirusurilor retrovirale.

Semnalul de inserție al poliA este considerat ca fiind și terminatorul în transcriere. Structura lui genică este TTATTT corespunzînd la ARNm cu secvența AAUAAA. La nivelul —30— —50 se găsește și codonul ADN, corespunzător codonilor terminatori de sinteză a proteinei, adică fie UAA, fie UAG, fie UGA.

În conformitate cu descrierea respectivelor secvențe-„semnal“ rezultă că gena virală este mai întinsă decît ceea ce indică raportul de codificare a 3 nucleotide/1 aminoacid. Segmentul traductibil format din șirul de codoni corespunzător la aminoacizi este situat între segmente netraduse, dar transcrise în ARNm (vezi fig. 8-19). Fragmentele transcrise-netraduse au rol în inițierea, respectiv terminalizarea sintezei lanțului polipeptidic corespunzător segmentului codonic. Un segment genomic cuprins între un codon ADN corespunzător codonului AUG inițiator și un codon ADN corespunzător codonilor terminatori în sinteza proteinelor — UAA, UAG sau UGA — se numește șir nucleotidic deschis citirii sau traducerii (cf. engl, *open reading frame*, sau *ORF*, sau *orf)* (fig. 8-20). În general un *ORF* cuprinde cel puțin 100 de codoni cu corespondență aminoacidică potențială. Segmentele *ORF* au dobîndit, de cînd cu secvențierea ADN, semnificații particulare. În primul rînd, s-au observat la virusuri segmente *ORF* care parțial se suprapun, așa cum se observă în genomul de HBV (vezi fig. 8-14), ceea ce semnifică o suprapunere de gene. Aceasta înseamnă că pe genele suprapuse are loc un trafic „dirijat“ de transcriere : cînd este transcris unul din *ORF*-uri, celălalt nu este transcris și viceversa. În al doilea rînd, secvențierea ADN a permis descrierea de segmente *ORF* cărora nu li s-au găsit corespondențe proteinice. De exemplu, *ORF*-urile A și B din genomul proviral SIDA (al retrovirusului sindromului de imunodeficiență dobîndită sau *Aquired Immunodeficitary Syndrom*, AIDS) (vezi fig. 8-20). Segmentele *ORF*, observate mai întîi la virusuri, anticipează la genomurile celulare

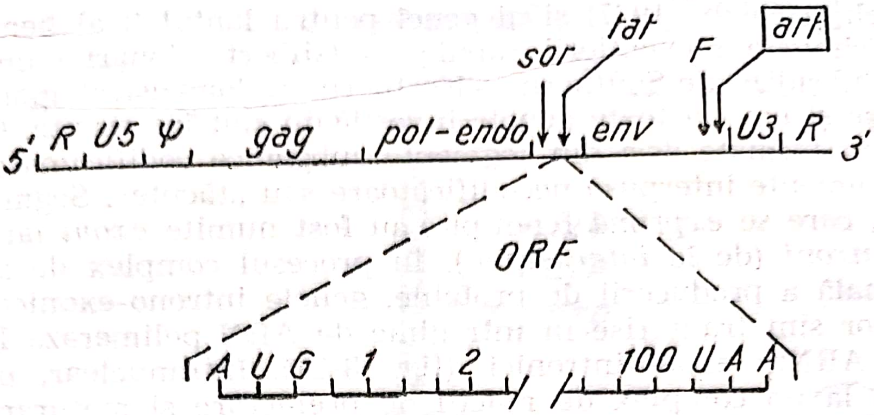


Fig. 8-20 — Un genom ARN de retrovirus (HIV). 5', 3' —extremitățile moleculei liniare de ARN ; *R* — repetitivă scurtă ; *U5* — secvență unică situată la extremitatea 5' ; φ — segment scurt inductor de împachetare în capsidă ; *gag, pol, env* — gene pentru proteinele virale cunoscute comune retrovirusurilor (*gag* — proteine interne, *pol* — reverstranscriptaza ; *env* — proteine de înveliș) ; *sor* — genă-reglator (cf. engl. *site of regulator*) ; *tat* — genă pentru proteină *trans-activator* ; *F* — genă de activare ; *art* — genă-antirepresor în traducere. (Cu puțin timp în urmă genele *sor, tat, F* și *art* erau doar *ORF*-uri) (detalii în text).

existența de proteine cu funcții importante dar încă neizolate, așa cum ar fi cazul factorilor de reglare din mitoză și/sau din dezvoltarea timpurie a organismului uman.

8.8.4. GENE DISCONTINUE (INTRONO-EXONICE) DESCRISE MAI ÎNTÎI LA VIRUSURI ȘI CORESPONDENȚA : O GENĂ — MAI MULTE PROTEINE

Investigînd proteinele nestructurale și moleculele de ARNm corespunzătoare produse în celule infectate cu adenovirusuri, Berget și colab. (1977) au constatat că moleculele de ARN care hibridizează cu sonde de ADN viral sînt heterogene și că aceleași fragmente-sonde de ADN hibridizează și cu molecule lungi de ARN și cu molecule mai scurte de ARN. Autorii au dedus atunci că genomul de virus este transcris în molecule lungi de ARN care apoi sînt clivate în fragmente mici intermediare și reunite în molecule mai mici de ARNm printr-un mecanism de clivaj-joncțiune (cf. engl. *splicing*). Deducțiile au fost făcute pe baza rezultatelor obținute cu tehnici de tip Southern — Northern descrise mai sus. Tot atunci s-a precizat pentru prima dată că structura genei corespunzătoare unei proteine este discontinuă, în sensul că posedă fragmente necodonice interpuse între fragmente cu corespondență în secvența aminoacidă din proteinele corespunzătoare. S-a constatat apoi că discontinuitatea este o trăsătură generală a genelor eucariote producătoare de proteine, descoperindu-se aspectul întrerupt al genei pentru ovalbumină

(Breathnach şi colab., 1977) şi al genei pentru lanţul β al hemoglobinei murine. Tehnicile secvenţierii rapide — Gilbert, clonările de gene în bacterii şi hibridizările Southern — Northern au domenstrat apoi, cel puţin la mamifere şi om, că toate genele investigate sînt întrerupte. Genele de eucariot sînt formate deci din segmente subgenice codificatoare, despărţite prin segmente interpuse necodificatoare sau „tăcute“. Segmentele codificatoare, care se *exprimă* fenotipic, au fost numite *exoni* iar cele „tăcute“ — *introni* (de la *intervening*). În procesul complex de specificare informaţională a producerii de proteine, genele introno-exonice ale adenovirusurilor sînt transcrise în întregime de ARN polimeraza II în mari precursori ARNm exono-intronici (fig. 8-21). Intranuclear, precursorii sînt expuşi la un complex de reacţii de prelucrare şi maturare, printre care şi o reacţie de clivaj-joncţiune a ARN (*RNA-splicing*), prin care porţiunile intronice sînt eliminate. Reacţia de clivaj-joncţiune implică recunoaşterea nivelurilor de delimitare dintre transcripţi exonici şi transcripţi intronici de către un agregat corpuscular de clivaj-joncţiune, selecţionarea moleculei de ARNm precursor la nivelul legăturilor transcript exonic — transcript intronic, urmată de joncţiunea transcripţilor exonici şi stabilirea continuităţii informaţionale a mesajului codonic purtat de respectivul ARNm (vezi fig. 8-21). Segmentele intronice sînt eliminate şi degradate. Recunoaşterea delimitării exono-intronice se datorează la două situsuri-„semnale“ de recunoaştere, unul „donator“ şi altul „acceptor“, situate la capetele transcripţilor intronici. Cele două semnale sînt aceleaşi la toţi intronii. Agregatul de clivaj-joncţiune interacţionează cu aceste situsuri, le apropie pînă la adiacenţă, apropiind astfel şi exonii despărţiţi de intronul interesat ; intronul devine astfel o buclă pediculată care este apoi eliminată prin clivaj-joncţiunea menţionată mai sus. La precursorii ARNm ai adenovirusurilor, nivelurile de clivaj joncţiune sînt de profiluri diferite : unele leagă toate fragmentele exonice din precursorul ARNm şi produc un ARNm matur corespunzător unei proteine mari de 38 kilodaltoni (fig. 8-22) ; altele cuprind în buclele de eliminare transcripţi introno-exonici, legarea efectuîndu-se numai pentru numere incomplete de exoni, motiv pentru care rezultă molecule ARNm mature de lungimi diferite care corespund la proteine diferite, de 36 kilodaltoni, 28 kilodaltoni, 25 kilodaltoni etc. Astfel, clivaj-joncţiunea din prelucrarea ARN are un caracter oscilant iar o genă virală, de exemplu gena E1A de adenovirus, produce peste opt proteine diferite, cu funcţii diverse. Genomul de adenovirus produce în cursul infecţiei transcripţi lungi timpurii într-un număr evident mai mic decît proteinele timpurii. Aspectul versatil al clivaj-joncţiunii în prelucrarea ARN transcris de genomul viral nu este aleator, deoarece la fiecare infecţie se produc aceleaşi profiluri de ARNm şi proteine. Factorii de control al spectrului de clivaj-joncţiune oscilantă ordonată nu sînt încă precizaţi, dar prin acest mecanism se asigură ca o genă să producă mai multe proteine. Mecanismul oscilator al clivaj-joncţiunii, descris la adenovirusuri, are loc şi în prelucrarea macroprecursorilor ARNm pentru proteine de tip celular, aşa cum s-a demonstrat la moleculele de ARNm corespunzătoare la imunoglobuline, respectiv la calcitonine şi la fibrinogen (Milner-White, 1984). Reacţia de clivaj-joncţiune oscilantă, şi implicit prezenţa intronilor, ar

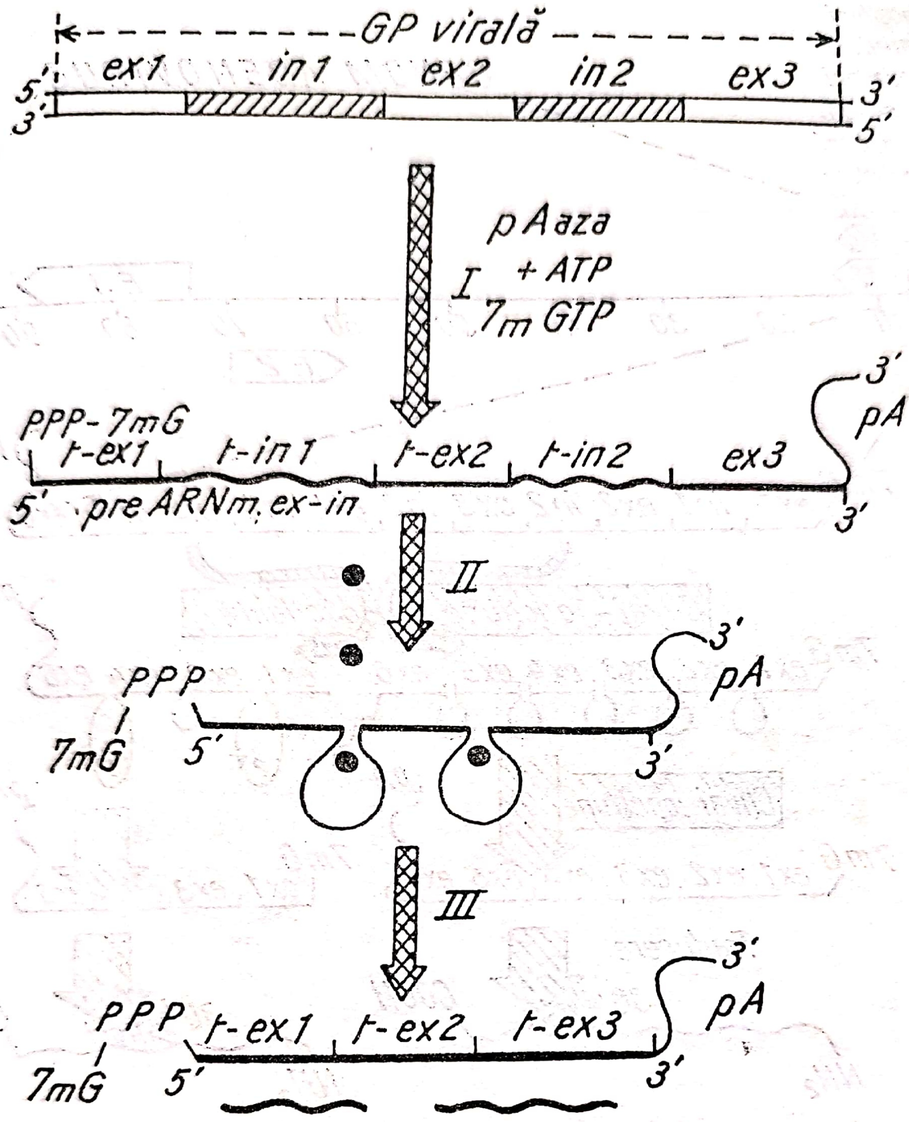

GP virală
ex1
in1
ex2
in2
ex3
5'
3'
3'
5'
pAaza
+ATP
I
7m GTP
PPP-7mG
t-ex1
t-in1
t-ex2
t-in2
ex3
3'
pA
5'
pre ARNm. ex-in
3'
II
3'
PPP
pA
7mG
5'
3'
III
3'
PPP
t-ex1
t-ex2
t-ex3
pA
7mG
5'
3'

Fig. 8-21 — Genă discontinuă introno-exonică producătoare de proteină virală şi prelucrarea transcriptului ARN.

GP — genă pentru proteină virală; *ex 1, ex 2, ex 3* — exoni; *in 1, in 2* — introni; *pA aza* — poliadenilpolimeraza, enzimă care sintetizează coada poliadenilică la extremitatea 3′ a ARNm precursor (pre-ARNm ex-in); *I* — transcrierea întregii gene exono-intronice într-un pre-ARNm cu porţiuni transcrise atît intronice, cît şi exonice (*t-ex, t-in* — transcript exonic-intronic); *II* — efectul conformaţional de adiacenţă a extremităţilor exonice exercitat de complexul de clivaj-joncţiune (●) (*splicing*), denumit şi snRNP (*small nuclear ribonuclein particle*); ∼∼ — transcripţi intronici: *III* — legarea cap la cap a exonilor prin joncţiune care urmează clivajului şi eliminării transcripţilor intronici şi formarea ARNm matur.

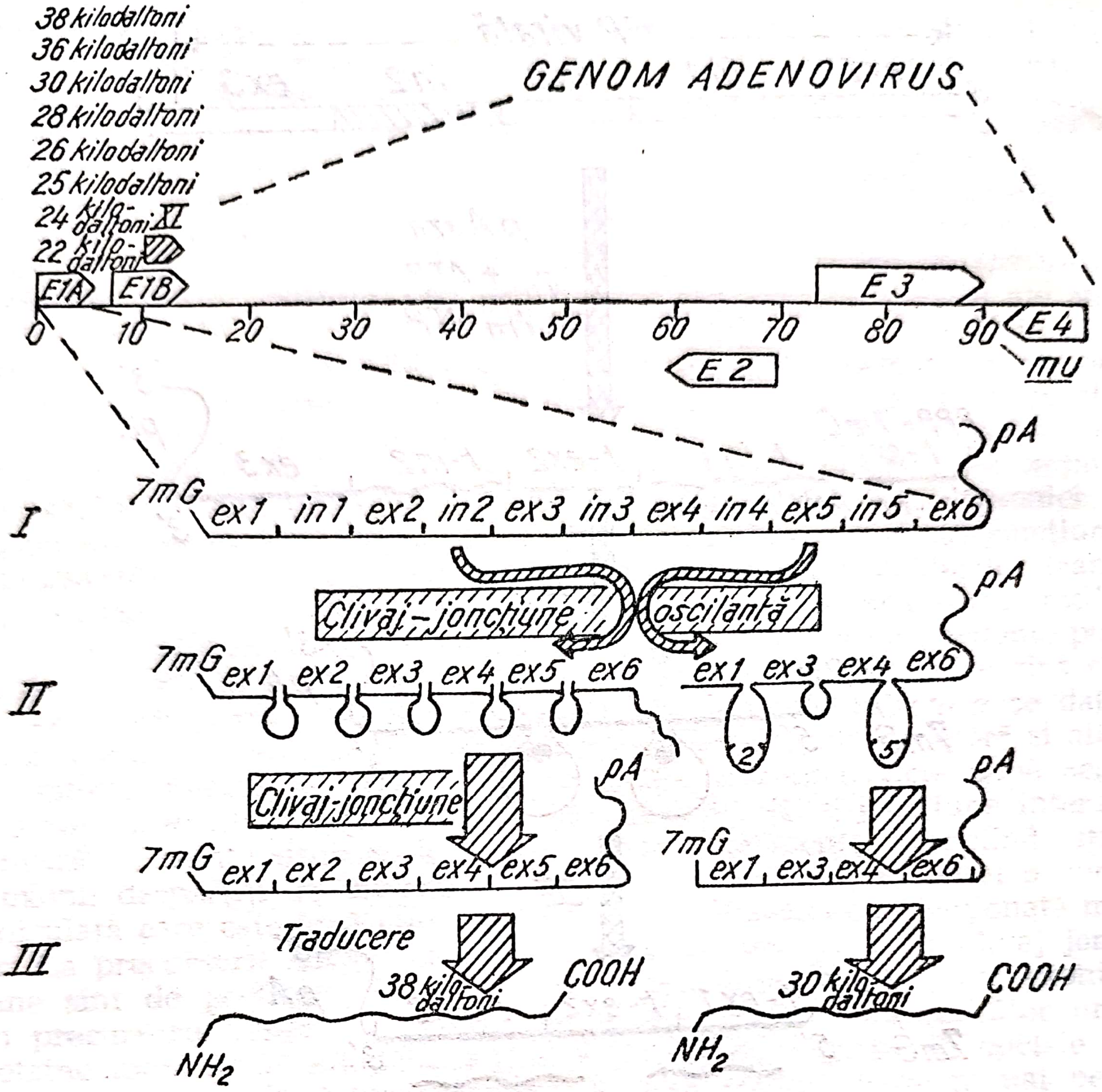

38 kilodaltoni
36 kilodaltoni
30 kilodaltoni
28 kilodaltoni
26 kilodaltoni
25 kilodaltoni
24 kilo-daltoni XI
22 kilo-daltoni
GENOM ADENOVIRUS
E1A
E1B
E3
E4
E2
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
mu
I
7mG
ex1
in1
ex2
in2
ex3
in3
ex4
in4
ex5
in5
ex6
pA
Clivaj-joncţiune
oscilantă
II
7mG
ex1
ex2
ex3
ex4
ex5
ex6
pA
ex1
ex3
ex4
ex6
2
5
Clivaj-joncţiune
pA
7mG
ex1
ex2
ex3
ex4
ex5
ex6
pA
7mG
ex1
ex3
ex4
ex6
III
Traducere
38 kilo-daltoni
COOH
NH2
30 kilo-daltoni
COOH
NH2

Fig. 8-22 — Mecanismul oscilant (versatil) al prelucrării pre-ARN, demonstrat la adenovirusuri, prin care o genă produce mai multe proteine diferite dar cu omologii structurale.

Gena *E1A* care cuprinde 1,6 kb produce 8 proteine cu greutăţi moleculare între 22 kilodaltoni şi 38 kilodaltoni şi cu resturi aminoacil între 200 şi 350; acest rezultat derivă din aspectul oscilant al clivaj-joncţiunii pre-ARNm transcris pe gena E1A (sau E1a) aşa cum se arată în schemă la nivelurile *I*, *II* şi *III*; aşa cum se ilustrează, snRNP-urile de clivaj-joncţiune pot cuprinde în buclele de eliminare şi transcripţi exonici (*II* dreapta — 2,5) nu numai transcripţi intronici (*II* stînga) şi dau naştere la molecule diferite de ARNm corespunzătoare la proteine de 38 kilodaltoni, respectiv de 30 kilodaltoni. În schemă s-au considerat numai o oscilaţie de clivaj-joncţiune şi numai 6 exoni. Diferitele tipuri de clivaj-joncţiune produc cele 8 molecule diferite de ARNm matur necesare celor 8 proteine ale căror greutăţi moleculare sînt înşiruite în coloană deasupra genei E1A.

(Astfel, o genă mică produce un număr mare de proteine.)

conferi virusurilor un avantaj selectiv, în sensul că un genom mic poate produce mai multe proteine şi să îndeplinească în consecinţă mai multe funcţii decît îi permit dimensiunile.

8.9. IMPLICAŢIILE CUNOŞTINŢELOR DE GENETICĂ ÎN EPIDEMIOLOGIA ŞI PROFILAXIA BOLILOR INFECŢIOASE VIRALE

În raport cu nivelul prezent al cunoaşterii virusurilor, infecţioniştii şi epidemiologii preocupaţi de infecţiile virale sînt solicitaţi, mai mult decît în alte discipline medicale, să-şi însuşească atît cunoştinţe ale geneticii umane, cît şi aprofundarea geneticii virale (Cajal, 1983). Un argument, din multe altele dar dintre cele mai convingătoare, îl constituie rolul predominant pe care îl exercită infecţiile cu virusul hepatitei B în etiologia cancerului hepatic şi corelarea acestui aspect cu interacţiunile dintre genomul viral şi citogenom în procesele de integrare genetică recombinaţională. Genetica virusurilor permite o amplificare evidentă a înţelegerii mai multor probleme: *a)* evoluţia epidemiilor; *b)* optimizarea clasificării virusurilor prin caracterizări genomice şi identificarea tulpinilor circulante cu un mai mare discernămînt; *c)* anticiparea implicaţiilor patogenice prin cunoaşterea relaţiilor genom viral — citogenom; *d)* perfecţionarea profilaxiei antivirale prin vaccinuri. Aceste afirmaţii sînt ilustrate în continuare prin cîteva exemple:

a) Referitor la evoluţiile epidemiilor de gripă, viroză respiratorie de importanţă primară pentru sănătatea publică, sînt de mult discutate implicaţiilor mutaţiilor şi recombinărilor prin reasortare în geneza marilor comutări antigenice de la originea pandemiilor (Fenner, 1976). S-a sugerat că reactivarea epidemică s-ar datora evenimentelor genetice derulate în rezervorul natural interepidemic. Secvenţierea completă a genelor pentru hemaglutinina de la tulpina umană A/Hong Kong/1968/H3N2 şi de la tulpina izolată de la raţă A/Ucraina/1963/H3N8 a demonstrat o omologie structurală de peste 96% între genele hemaglutininice ale celor două tulpini virale (Fang şi colab., 1981). Această constatare a permis autorilor să conchidă că marea pandemie de gripă dată de tulpina Hong Kong a avut ca progenitor de reasortare genomică tulpina de raţă şi tulpina gripală umană a pandemiei precedente cu structura H2N2 (vezi fig. 8-10).

b) Mijloacele serologice cele mai sofisticate pînă la folosirea anticorpilor monoclonali au pus în evidenţă 41 de serotipuri adenovirale, împărţite pe criteriile hemaglutinabilităţii hematiilor de şobolan şi *rhesus* în trei grupe (grupele I—III) iar pe baza oncogenităţii primare pe hamsterul nou-născut în patru subgenuri (A, B, C, D). Investigaţiile moleculare ale fenotipului viral prin analiza proteinelor nestructurale a permis identificarea a şapte subgenuri (A, B, C, D, E, F, G). În prezent, pentru diagnosticul tulpinilor circulante se preconizează criteriul genomic, adică identificarea de entităţi virale distincte circulante, prin analiza spectrelor electroforetice ale fragmentelor genomice (de ADN) obținute cu endonucleaze de restricție (Wadell, 1984), denumite spectre de restricție. Prin analize ale spectrelor de restricție *Sma*I a șapte serotipuri de la subgenuri diferite s-au obținut diferențe indubitabile (*Sma*I — endonucleaza de restricție purificată din bacteria *Serratia marcescens*), iar analiza a opt serotipuri pentru spectrul *Hind*III a indicat diferențe clare (*Hind*III — endonucleaza de restricție de la *Haemophilus influenzae* Rd.). Se conchide că analizele genomice prin spectre de restricție oferă posibilitatea unei optimizări în urmărirea distribuției epidemiologice a tulpinilor circulante și a corelațiilor dintre caracterele lor de patogenitate.

c) Tot în problema identificărilor moleculare se folosesc în prezent sondele moleculare genetice (*DNA probes, RNA probes*) ce pot fi comparate cu un „laț" capabil de „a prinde" un fragment determinat de ADN a cărui moleculă o recunoaște. La virusuri, ele permit localizarea genelor sau chiar identificarea bacteriei de origine care a produs maladia infecțioasă, tot datorită ADN marcat pe care aceste sonde genetice le posedă. Cu alte cuvinte, sondele moleculare reprezintă căile de acces direct la nivelul ADN, ele putînd detecta unele maladii ereditare chiar în stadiul prenatal.

Se cunosc două metode de a marca sondele moleculare care dau și o clasificare a acestora :

— *Sondele moleculare „calde"*. Această denumire delimitează sondele moleculare marcate radioactiv cu ^{32}P sau ^{35}S. Dar acest tip de marcaj prezintă două inconveniente : pe de o parte, durata vieții lor este limitată (după 14 zile ^{32}P își pierde jumătate din radioactivitatea sa) și, pe de altă parte, aceste sonde sînt periculoase de obținut din cauza radioactivității pe care o emit și din această cauză nu pot fi produse decît în laboratoarele care beneficiază de instalații de mare securitate. În schimb, aceste sonde moleculare „calde" au avantajul că sînt foarte sensibile : ele produc prin autoradiografie pete (urme) mult mai contrastante față de cea de-a doua categorie de sonde.

— *Sondele moleculare „reci"*. Folosesc ca marker un produs chimic neutru. Marcajul poate fi direct sau indirect. În cazul marcajului direct poate fi utilizată fie o enzimă (peroxidaza sau fosfataza alcalină) fie o moleculă fluorogenică placată direct pe ADN al sondei.

În cazul marcajului indirect este folosită vitamina H (biotina) care, avînd moleculă mică, are avantajul că stînjenește mai puțin realizarea hibridării decît moleculele enzimatice mari.

Sondele moleculare „reci" marcate direct enzimatic pot fi vizualizate prin reacția lor cu un substrat sau cu o substanță care să aibă posibilitatea de a reacționa cu enzima respectivă. Sub acțiunea enzimei, substratul/substanța este degradată printr-un proces chimic într-o altă substanță care capătă o culoare diferită de cea a substratului inițial. În cazul acesta pot fi reperate și eventualele hibridări.

În cazul unei sonde moleculare „reci", care este marcată cu ajutorul unei molecule fluorescente, se îndreaptă către folia (membrana) de nitrat de celuloză o lampă de UV. Lumina UV, cînd întîlnește o moleculă de fluorocrom, emite o lumină caracteristică specifică : verde în cazul fluoresceinei și roșie în cazul rodaminei.

În cazul unei sonde moleculare „reci“ marcate indirect cu ajutorul biotinei, se recurge la posibilitatea acesteia de a reacționa și de a se lega foarte strîns de avidină (din albușul de ou). Această fixare strînsă a avidinei de biotină nu este însă detectabilă în sine, ci doar prin legarea în prealabil (indirectă) a avidinei de o altă enzimă care poate fi ea însăși detectată printr-un proces similar celui descris anterior.

Ca o privire de ansamblu, sondele moleculare „reci“ sînt de 10—100 de ori mai puțin sensibile decît cele „calde“, de aceea ar trebui pus la punct un sistem de a amplifica semnalul transmis de ele.

Sondele moleculare genetice au fost utilizate deja pentru virusul hepatitei B, acestea avînd posibilitatea de a detecta prezența genelor virale direct din probele de sînge. Principiul metodei poate fi rezumat astfel : în laborator au fost fabricate multiple exemplare de ADN viral monocatenar, marcate radioactiv. În paralel se face o cultură limfocitară care are ca punct de plecare o probă de sînge recoltată de la un subiect suspect ca fiind purtătorul acestui virus. O soluție care conține suspensia în număr mare (prin clonare moleculară) a copiilor de ADN viral monocatenar marcate radioactiv *(DNA probes)* este pusă în contact cu ADN denaturat (monocatenar) din limfocite, care este fixat de membrana de nitrat de celuloză în vid și la 80°C. Dacă acest din urmă ADN prezintă o secvență de ADN viral (aceasta în cazul în care provine de la un pacient ce poartă infecția respectivă), ADN monocatenar marcat radioactiv va recunoaște aceste secvențe și se va împerechea cu ele. În final pot fi eliminate pe un film radiografic catena ADN viral marcată radioactiv.

Se speră ca acest test să poată fi pus la punct în cel mai scurt timp pentru detectarea virusului SIDA.

În concluzie, avantajele sondelor moleculare genetice folosite pe scară tot mai largă sînt următoarele : *DNA probes, RNA probes* sînt foarte sensibile, reacționează ușor, au o mare specificitate de fragment, nu sînt scumpe și în același timp sînt ușor de realizat.

d) Genetica virusurilor a adus un important aport în cunoașterea interacțiunilor genom viral — citogenom în epidemiologia cancerului hepatic și a hepatitei virale B, cît și a mecanismului general al oncogenezei.

e) Așa cum s-a subliniat și în introducere, vaccinarea antirabică cu tulpina virală izolată de Pasteur în condiții de laborator a fost consecința selecției intuitive a unui mutant al virusului rabic de stradă. Selecția de mutanți și recombinanți a fost folosită pentru obținerea de tulpini vaccinante în diferite viroze. Metodele genetice clasice sînt folosite în continuare pentru menținerea tulpinilor atenuate vaccinante. De exemplu, tulpinile atenuate prin cultivarea la rece a virusurilor polio sînt predispuse la retromutații din care rezultă virusuri de tip sălbatic. Purificarea tulpinilor atenuate se efectuează prin clonare, utilizîndu-se tehnica plajelor. Plajele caarcteristice virusului atenuat sînt recoltate, multiplicate în culturi celulare, retestate pentru puritate tot prin tehnica plajelor și încercate pentru starea atenuată pe maimuțe.

Monitorizarea tulpinilor vaccinante gripale în raport cu profilul genetic al tulpinilor circulante este efectuată prin recombinări de reasortare genomică efectuate periodic în laborator. De exemplu, Petrescu și colab. (1984) urmăresc profilul epidemic teritorial, izolează tulpini circulante cu ajutorul cărora prepară recombinanţi de virus gripal optimizaţi atît pentru eficacitatea vaccinării profilactice, cît şi pentru producţia masei virale necesare preparării vaccinului.

Rezultatele cele mai interesante au fost obţinute însă în problema prioritară a infecţiilor cu HBV. Vaccinul actual utilizat pe scară largă şi preparat de casele Merck, Sharp Dome constă din AgHBs purificat şi concentrat din plasma umană recoltată de la purtători de AgHBs (Vyas şi Blum, 1984). Costul acestui vaccin este ridicat prin acţiunile de depistare şi selecţionare a donatorilor cei mai potriviţi, cît şi prin procedeele de purificare a antigenului. Tehnicile moderne ale geneticii virusurilor oferă soluţii mai economicoase. De exemplu, Smith şi colab. (1983) au obţinut un recombinant în care gena *s* din genomul HB (vezi fig. 8-14) a fost integrată în genomul virusului vaccinal. Recombinantul este un virus viu producător stabil de AgHBs şi utilizabil în vaccinarea antihepatitică, asemănător vaccinării care a dus la eradicarea variolei. O astfel de realizare a fost posibilă numai după cunoaşterea genomului viral prin tehnici aparţinînd exclusiv geneticii moleculare virale.

8.10. CONCLUZII ŞI PROSPECTĂRI

1. În ciuda dependenţei stricte de celulele-gazdă, virusurile sînt entităţi de organizare a materiei vii cu structura, fiziologia şi genetica lor proprie.

2. Genomul viral, deşi mult mai mic decît al celulelor, prezintă o mare heterogenitate şi poate fi monomolecular sau plurimolecular, alcătuit din ADN (dezoxiribovirusuri) sau ARN (ribovirusuri). Atît genomul ADN, cît şi cel ARN pot fi de structură monocatenară liniară sau circulară dar sînt şi virusuri cu genom bicatenar, fie ADN, fie ARN.

3. Virusurile manifestă mutaţii spontane şi mutaţii induse prin agenţi mutageni ; în infecţii mixte dau recombinări intramoleculare care stau la baza stabilirii de hărţi genetice corespunzătoare la macromoleculele de acizi nucleici. Virusurile cu genomul multisegmentar (multimolecular), în infecţii mixte, dau recombinări de reasortare genomică. Atît mutaţiile, cît şi recombinările au permis îmbunătăţirea calităţii vaccinurilor şi monitorizarea producţiei de vaccinuri corespunzătoare, cu tulpinile virale circulante în epidemii. Este vorba mai ales de vaccinul antigripal. Mutaţiile şi recombinările naturale pot explica evoluţia epidemică a unor afecţiuni virale.

4. Genomul dezoxiribovirusurilor poate fi angajat în recombinări cu genomul celulelor-gazdă, fie prin integrare de fragmente citogenomice în genomul virionului matur (adenovirusuri), fie prin integrarea de genom viral în citogenom.

5. Tehnicile de secvenţiere rapidă a ADN de tip Gilbert şi clonare moleculară au permis fie aprofundarea cunoaşterii genomurilor virale aprioric studiate prin metode clasice, fie descifrarea structurii unor genomuri virale mai înainte necunoscută ; de exemplu, structura secvenţială a genomului de la virusul hepatitei B.

6. Izolarea proteinelor virale şi cea a moleculelor de ARNm cuplate cu tehnicile de hibridizare au permis precizări asupra corespondenţei genă-funcţie.

7. Investigaţiile moleculare ale geneticii virusurilor au adus un aport deosebit în creşterea nivelului de cunoaştere a geneticii generale. În experienţe cu virusuri, acizii nucleici infectioşi au fundamentat conceptul că ei constituie materialul genetic. La virusuri s-a demonstrat retrotranscrierea şi structurile intime de reglare ca fiind structuri promotoare de tip TATAA şi structuri terminale de tip AATAAA. Genetica moleculară a virsurilor a deschis drumul chirurgiei genetice şi clonărilor moleculare, tehnologii denumite popular inginerie genetică.

8. Progresele geneticii virusurilor oferă largi perspective în optimizarea vaccinărilor pentru combaterea de viroze care constituie probleme prioritare pentru sănătatea publică în întreaga lume, ca virozele respiratorii şi hepatitele virotice. Tot genetica virusurilor a permis abordarea, la un nivel aprofundat, a mecanismelor diferenţierii, a cunoaşterii mecanismelor de reglare a diviziunilor celulare şi a deviaţiilor acestora în oncogeneză.

Bibliografie selectivă

ANTOHI S., SAMUEL I., DUMITRESCU S. şi colab. — Rev. Roum. Méd., Virol., 1983, 34, 163.

ANTOHI S., ROJANSCHI D. HÖRER O. şi colab. — Acta Virol., 1984 28, 362.

ANTOHI S. — In Tratat de Fiziopatologie, Saragea M. (red), vol. I, P. 216—217, Edit. Academiei R.S.R., 1985.

BACHRACH U., DON S., WIENER J. — J. Gen. Virol., 1974, 22, 451.

BENZER S. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1961, 47, 403.

BERGET M. S., MOORE C., SHARP P. A. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 3 171.

CAJAL N. — Diagnosticul de laborator al inframicrobiozelor umane, Edit. Academiei R.S.R., Bucureşti, 1959.

CAJAL N. — Rev. Roum. Méd., Virol., 1983, 34, 53.

COGGIN J. H., BELLOMY B. B. — Amer. J. Pathol., 1983, 110, 254.

CONTENTE S., DUBNAU D. — Molec. Gen. Genet., 1979, 167, 251.

DIETZSCHOLD B., WUNNER W. H., VIKTOR T. J. şi colab. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80, 70.

DOERFLER W. — Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1984, 109, 218.

DOERFLER W. — Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1984, 108, 79.

DOWNIE A. W., HADDOCK D. W. — Lancet, 1952, 1, 1 049.

DULBECCO R. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1952, 38, 747.

FANG R., MIN JOU W., HUYLEBROEK F. şi colab. — Cell, 1981, 25, 315—323.

FENNER F., SAMBROOK J. F. — Ann. Rev. Microbiol., 1964, 18, 47.

FENNER F. — Ann. Rev. Microbiol., 1970, 24, 297.

FENNER F., McAUSLAN B. R., MIMS C. A. şi colab. — The Biology of Animal Viruses, p. 284—285, Academic Press Inc., New York, 1974.

FENNER F., WHITE D. O. — Medical Virology, ed. a II-a, p. 70—84, Academic Press Inc., New York-San Francisco-Londra, 1976.

FIERS W., CONTRERAS R., HAEGEMAN G. şi colab. — Nature (London), 1978, 273, 113.

FREESE E. — În Methodology in Basic Genetics, Burdette W. J., (red.), p. 3—18, Holden-Day Inc., San Francisco, 1963.

FREESE-BAUTZ E., FREESE E. — Virology, 1961, 13, 19.

FRIEFELD B. R., LICHY J. H., FIELD J. şi colab. — Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1984, 110, 221—255.
GIBSON W., ROIZMAN B. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1971, 68, 2 818.
GIERER A., SCHRAMM G. — Nature, 1956, 177, 702.
GIERER A. — Prog. Biophys. Res., 1960, 10, 299—342.
GILBERT W. — Science, 1981, 214, 1 305—1 312.
HERSHEY A. D., CHASE M. — Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol., 1951, 16, 752.
JACOB F., WOLLMAN E. L. — În The Viruses, vol. II, p. 318, Academic Press Inc., New York — Londra, 1959.
LANZER W., HOLOWCZAK J. A. — J. Virol., 1975, 16, 1 254.
LEDINKO N., HOPKINS S., TOOLAN H. — J. Virol., 1969, 5, 19.
LEMON S. — New Engl. J. Med., 1985, 313, 1 059.
LEVINE A. J. — Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1982, 101, 1.
LEVINE A. J. — Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1984, 110, 143.
LURIA S. E., DELBRÜCK M. — Genetics, 1943, 28, 491.
LURIA S. E. — Ann. Rev. Microbiol., 16, 205.
LURIA S. E., DARNELL J. E., BALTIMORE D. şi colab. — General Virology, ed. a III-a, John Wiley and Sons, New York, 1978.
MANDEL M., HIGA A. — J. Mol. Biol., 1970, 53, 159.
MAXAM A., GILBERT W. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 560.
MILNER-WHITE E. J. — Trends Biochem. Sci., 1984, 9, 517.
NAJARIAN R., CAPUT D., GEE W. şi colab. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 2 143.
NOTTINGER J. P., DELLAPORTA S. L. — În Plant Infections Agents, Viruses, Viroides and Sattelites, p. 126, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, 1983.
PETRESCU AL., CAJAL N. — Rev. Roum. Méd., Virol., 1984, 35, 307.
PRIBNOW D. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1975, 72, 784.
RABSON A. B. — Cell, 1985, 40, 477.
RAINA A., TUOMI K., MÄNTIJÄRVI R. — Med. Biol., 1981, 59, 428.
REDDY V. B., THIMMAPAYA B., DHAR B. şi colab. — Science, 1978, 200, 494.
REDEKER A. G. — Ann. Intern. Med., 1983, 98, 542.
RIESNER D., STEGER G., SCHUMACHER J. şi colab. — Biophys. Struct. Mech., 1983, 9, 145.
RIZZETTO M., PURCELL R. H., GERIN J. L. — Lancet, 1980, 1, 1 215.
ROBERTSON H. D. — În Plant Infectious Agents — Viruses, Viroids and Satellites, p. 1—15, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, 1983.
SANGER F., COULSON A. R. — J. Mol. Biol., 1975, 94, 441.
SANGER F., AIR G. M., BARRELL B. G. şi colab. — Nature, 1977, 265, 687.
SCHUSTER H., SCHRAMM G. — Z. Naturforsch., 1958, 13b, 697.

9

Persistența virală

În măsura în care vaccinările și chimioterapicele vor limita incidența virozelor acute, conținutul virusologiei medicale va fi orientat, în viitor, spre elucidarea aspectelor clinice cronice determinate de persistența virală. Profesorul Șt. S. Nicolau a semnalat această modificare încă din anul 1965. În concepția sa, virionii nu distrug totdeauna celula-gazdă, ci pot realiza un echilibru persistent (biofiție), care afectează însă ambii parteneri. Adaptarea virală la această stare, persistența genomului celular integrat (artrovirus) sau nu (infravirus) precum și consecințele clinice variate (Nicolau, 1967) au fost ulterior amplu argumentate.

9.1. DEFINIȚIE ȘI CLASIFICARE

Fenner și White (1976) definesc infecțiile virale persistente drept condițiile în care virusul sau, cel puțin genomul viral, este conservat în gazdă pentru o perioadă îndelungată de timp. În mod practic, această categorie se deosebește radical de cursul evolutiv ciclic care caracterizează cele mai multe viroze acute, autolimitante. Cu toate acestea, bolile umane asociate persistenței virale urmează cel mai adesea infecțiilor acute. Iată cîteva exemple :

— infecțiile herpetice acute, fie cu virusul herpes simplex 1 și 2, fie cu virusul varicella-zoster se vindecă fără ca organismul să se sterilizeze de virus. Acesta rămîne latent în anumite sedii inaccesibile controlului imun și este sursa recurențelor herpetice sau a zonei zoster ;

— infecțiile cu HBV și, probabil, cu virusurile hepatitice nonA-nonB sînt urmate în 5 —10% din cazuri de persistența antigenemiei. Această alternativă este sursa purtătorilor „sănatoși“ de virus care formează izvorul hepatitei posttransfuzionale. La o parte din acești subiecți, clinic, se diagnostichează hepatita cronică activă ;

— panencefalita sclerozantă subacută este o afecțiune neurologică rară ce debutează după o „incubație“ de 5—7 ani de la o rujeolă acută. Infecția inițială este, se pare, urmată de fenomene imunopatologice care determină tardiv o simptomatologie neurologică progresivă.

O categorie diferită de infecții virale cronice este determinată de familii sau genuri virale cu particularități replicative ce condiționează o evoluție lentă a simptomatologiei : lentivirusuri, oncovirusuri și spumavirusuri, toate încadrate în familia *Retroviridae*.

Lentivirusurile determină o patologie neurologică distructiv-progresivă, care evoluează lent, pe durata mai multor luni sau ani și este etichetată ca encefalopatie subacută spongiformă. Boala Creutzfeldt-Jakob este cel mai cunoscut exemplu din patologia umană.

Oncovirusurile sînt transmise mendelian la multe vertebrate. La unele specii sînt asociate cu boli maligne : leucemii, limfoame, sarcoame, carcinoame mamare etc. La om, virusurile leucemiei/limfoamelor cu celule T au fost incriminate în unele limfoame și leucemii cronice (sindromul Sézary, leucemia cu celule „în arici"), în limfadenopatii progresive, precum și în afecțiuni maligne asociate sindromului de imunodeficiență dobîndită (sarcomul Kaposi).

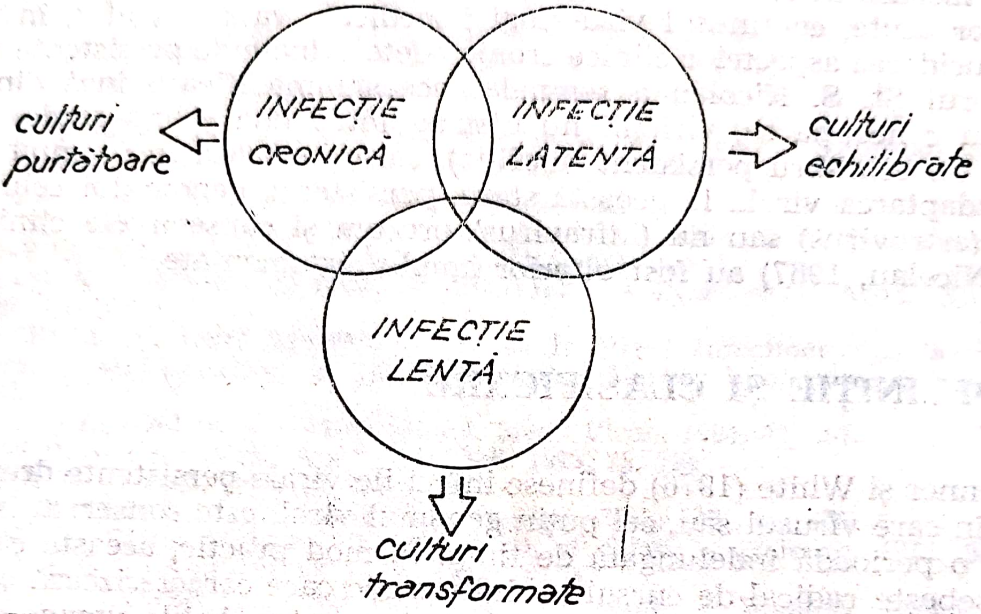


Fig. 9-1 — Cele trei categorii de infecții virale persistente *in vivo (în cerc)* și corespondentul lor în culturi celulare. Suprapunerea parțială a cercurilor denotă existența formelor clinice mixte.

Spumavirusurile infectează persistent, dar inaparent, o mare varietate de vertebrate. „Demascarea" infecției se face de obicei după efectuarea unor explante *in vitro* din țesuturile infectate. Se constată apariția „spontană" a unor sinciții vacuolate spumoase.

Varietatea manifestărilor clinice ale persistenței virale impune o clasificare a lor. Am adoptat o împărțire în care fiecare categorie de infecție persistentă *in vivo* are un corespondent *in vitro* — în culturi de celule (fig. 9-1). Infecțiile persistente *in vitro* sînt un model excelent pentru studierea factorilor dependenți de virus sau de gazdă care participă la patogenia infecțiilor persistente *in vivo*.

In vivo deosebim trei categorii de infecții virale persistente : cronice, latente și lente.

9.1.1. INFECȚIA VIRALĂ CRONICĂ

Este infecția persistentă cu virus totdeauna demonstrabil, chiar în absența simptomatologiei și a eliminării de virus. Un exemplu comun este hepatita cronică (HC), fie în varianta hepatită cronică persistentă, fie hepatită cronică activă. Hepatita cronică persistentă este considerată benignă, pe cînd cea activă progresează către ciroză. Există două aspecte ale relației virus — gazdă necesare pentru ca o infecție virală să se cronicizeze. În primul rînd, virusul sau variantele rezultate *in vivo* nu sînt citopatogene. În al doilea rînd, celula infectată trebuie să nu fie recunoscută de sistemul imun care elimină virusul sau celulele infectate. HBV nu este citopatogen și, de multe ori, purtătorii cronici de AgHBs au o histologie normală a biopsiei hepatice și probe funcționale hepatice normale. Mecanismul leziunilor hepatice în hepatita progresivă este imunopatic și rezultă din sensibilizarea celulară la antigene virale sau celulare virus-modificate.

9.1.2. INFECȚIA VIRALĂ LATENTĂ

Este infecția persistentă cu virus ocult între episoadele acute (recrudescente). Pentru această categorie, în patologia umană, sînt tipice infecțiile cu virusurile din genul *Simplexherpesvirus*. În cursul atacurilor acute prezența virusului este lesne de demonstrat; între atacuri virusul este latent în anumite celule nervoase, în care se realizează un blocaj al replicării și traducerii proteinelor virale, ceea ce împiedică de cele mai multe ori evidențierea lui prin tehnici obișnuite. Tehnicile moderne de secvențiere și analiză a genomului celular *(Southern blot analysis)* au demonstrat sistematic prezența unor copii ale genomului viral în ADN celular. Putem considera, în prezent, că distincția dintre infecțiile cronice și cele latente este numai aparentă, depinzînd de sensibilitatea metodelor folosite pentru evidențierea virusului ocult între recurențe, în infecțiile latente.

9.1.3. INFECȚIA VIRALĂ LENTĂ

Este infecția persistentă cu o largă perioadă de incubație, dar conducînd invariabil la leziuni histologice progresive și moarte. Virusurile pot fi evidențiate atît în perioada foarte lungă de incubație, cît și în cursul bolii clinice, fiind foarte rezistente la metodele convenționale de inactivare a infectivității. Din această categorie fac parte encefalopatiile subacute spongiforme (EPSS) descrise de Gajdusek și Gibbs (1969). EPSS umane pot avea o incidență sporadică (boala Creutzfeldt-Jakob), epidemică (boala Kuru) sau familială. Leziunea neurocitologică în toate aceste boli este vacuolarea progresivă — dendritică și axonală —, mai puțin pronunțată în corpii neuronali, astrocite și oligodendrocite. Spre deosebire de toate infecțiile virale ale sistemului nervos central, în EPSS nu există răspuns inflamator local (pleocitoză, creșterea IgG în lichidul cefalorahidian sau infiltrate perivasculare). Particularitățile remarcabile ale agenților EPSS în comparație cu virusurile convenționale au condus la ipoteza că acești agenți infecțioși sînt lipsiți de acizi nucleici și reprezintă în fapt proteine autoreplicative sau membrane autoreplicative. Astfel de proteine pot avea funcție derepresoare asupra unor secvențe din ADN celular care conțin informația pentru sinteza lor proprie.

9.1.4. INFECȚII VIRALE PERSISTENTE IN VITRO

Persistența virală în culturile de celule constituie o categorie heterogenă independent de virusurile implicate. Mecanismele care contribuie la realizarea raporturilor virus — celulă-gazdă permit individualizarea următoarelor tipuri de culturi infectate persistent : echilibrate, purtătoare și transformate.

Culturile echilibrate sînt rezultatul infecției cu virusuri necitopatogene. Fiecare celulă este infectată pentru că analiza lor clonală nu poate selecta celule necontaminate. Cu toate că celulele sînt permisive la infecția cu virus heterolog, ele rezistă, de obicei, la infecția cu virus omolog. În culturile echilibrate, genomul viral se replică independent de cel celular și se eliberează constant o cantitate mică de virus. Virusurile cu anvelopă (myxo- și paramyxo, arbo-, arena- și retrovirusurile produc acest tip de infecție persistentă.

Culturile purtătoare au caracteristic faptul că numai o parte din celule sînt infectate, restul sînt fie nesusceptibile, fie sînt protejate de inhibitori din mediul de cultură. Culturile purtătoare sînt rezultatul selecției unei populații de celule nesusceptibile. Ele pot fi „vindecate“ prin clonarea celulelor neinfectate în prezența anticorpilor antivirali. Invers, echilibrul virus — celulă-gazdă poate fi compromis prin îndepărtarea inhibitorilor din mediul de cultură sau prin anularea lor (de exemplu, prin anticorpi antiinterferon).

Culturile transformate reprezintă o situație calitativ modificată a persistenței virale : fragmente din genomul viral se integrează în cromozomii celulari sau funcționează ca epizomi. La om este cunoscută integrarea genomului HBV în linii celulare inițiate din carcinoame hepatice sau integrarea genomului EBV în linii limfoblastoide.

Caracteristicile culturilor transformate pot fi astfel rezumate :

— potențial de creștere exacerbat, manifest prin : *a)* formarea unor colonii tridimensionale cu celule întîmplător orientate, în locul unei creșteri ordonate, unistratificate, datorită pierderii inhibiției de contact ; *b)* capacitatea de menținere indefinită în culturi de celule ; *c)* eficiența de clonare crescută ; *d)* capacitatea de creștere în suspensie sau în agar semisolid cu mediu de creștere ce conține cantități minimale de ser de vițel ;

— modificări morfologice celulare și anomalii cromozomiale ;

— modificări metabolice celulare constînd în : *a)* producția sporită de acizi organici ; *b)* sinteza mărită de acizi mucopolizaharidici în constituția membranei celulare ; *c)* alte modificări constitutive ale membranei conducînd la aglutinabilitatea celulelor cu lectine ;

— capacitatea de a produce tumori maligne în urma inoculării la animale izoloage ;

— sinteza unor noi determinanți antigenici (virus-codificați) ; *a)* antigene de transplantare de suprafață și *b)* antigene tumorale intracelulare.

Transformarea celulară constituie domeniul cel mai investigat în legătură cu clarificarea oncogenezei virale.

9.2. MECANISME VIRALE IMPLICATE ÎN INIȚIEREA ȘI MENȚINEREA PERSISTENȚEI

Proprietăți intrinseci replicării virale, cît și mecanisme de apărare specifică și nespecifică ale gazdei contribuie la transformarea unor infecții litice în infecții cronice. Între factorii virali, Oldstone (1980) menționează : generarea particulelor defectiv-interferente, apariția unor mutante dependente de temperatură sau de gazdă, variația antigenică și integrarea genomului viral. Contribuția gazdei este evidențiată de factorii nespecifici de apărare sau de elementele efectoare ale răspunsului imun.

Trebuie semnalat că evoluția cronică a virozelor nu constituie o modificare de ansamblu a patologiei virale și nici regula rezoluției virozelor. Infecțiile cronice apar numai în anumite circumstanțe și nu sînt totdeauna asociate cu fenomene clinice. Infecțiile persistente inaparente sînt probabil foarte răspîndite și asocierea unor circumstanțe particulare (imunosupresie, îmbătrînire etc.) permite în prezent exprimarea lor clinică mai frecventă.

9.2.1. GENERAREA PARTICULELOR DEFECTIV-INTERFERENTE

Particulele defectiv-interferente (DI) reprezintă o clasă de mutante virale deosebită de particulele virale normale (pe care le vom numai particule standard) prin deleția unei porțiuni a genomului viral. Infecția simultană a celulelor cu particule DI și standard conduce la trei consecințe esențiale :

— *complementarea* între particulele DI și standard. Particulele DI sînt incapabile să se reproducă în absența replicării particulelor standard care complementează funcțiile pierdute de primele prin deleția genomică ;

— *interferența* sau competiția între particulele DI și standard, operantă în anumite secvențe ale ciclului replicativ. Fenomenul de interferență între particulele DI și standard se deosebește de cel cunoscut între virusurile înrudite, cu genom complet, prin faptul că interferența nu este reciprocă. Într-adevăr, în timp ce virusurile înrudite cultivate împreună produc amîndouă titruri mai mici, în cazul coinfecției cu particule DI și standard se produce numai diminuarea titrului particulelor standard. În plus, menționăm stricta specificitate a interferenței în sensul că este inhibată numai replicarea virusului complet din care derivă particulele DI, nu și alte virusuri ;

— *îmbogățirea stocului de virus progen* în particule DI comparativ cu stocul de virus inoculat. Această îmbogățire continuă contribuie la preponderența particulelor DI în populația virală și la temperarea infecției care devine persistentă. Fenomenul se datorește capacității virusului defectiv de a realiza anumite etape din ciclul de replicare mai eficient decît particulele standard.

Particulele DI sînt caracterizate de un pleomorfism marcat, precum și de modificări în proteinele structurale. Acestea sînt urmări ale alterării genomului viral prin deleție. Natura acestei deleții a fost mult controversată. Bean și Simpson (1976) au stabilit că pierderea genomică nu este nici selectivă, nici cantitativ stabilă.

Particulele DI sînt responsabile de inițierea și menținerea unor infecții virale persistente — în special cu virusuri ARN — atît în *in vitro*, cît și *in vivo*. Holland și colab. (1982) au arătat că generarea particulelor DI asigură evoluția genomului virusurilor ARN, în sensul dobîndirii unor avantaje selective care contribuie la lărgirea spectrului de gazdă, a tropismului tisular precum şi a variaţiilor antigenice care evită mecanismele imune de apărare ale gazdei. Două feluri de argumente susţin rolul particulelor DI în persistenţa virală :

— iniţierea unor infecţii cronice cu stocuri de virusuri avînd un conţinut înalt în particule DI ;

— demonstrarea directă a prezenţei particulelor DI, subgenomice, în mediul de cultură a celulelor cronic infectate.

Desigur că generarea particulelor DI nu reprezintă unicul mecanism de iniţiere a persistenţei, fapt relevat şi de existenţa unor linii celulare, cronic infectate, care nu produc particule subgenomice. Diferenţele între liniile celulare care produc sau nu particule DI sînt sintetizate în tabelul 9-I. La fel, *in vivo*, prezenţa particulelor DI trebuie suspectată mai cu seamă în următoarele situaţii :

— cînd izolarea unui agent viral este imposibilă la primul pasaj, dar rezultatele sînt pozitive după mai multe treceri oarbe sau prin cocultivarea celulelor infectate cu celule susceptibile ;

TABELUL 9-I

Caracteristici ale unor linii cronic infectate viral care produc sau nu particule DI

Caracteristica	Linii care produc particule DI	Linii care nu produc particule DI
Procentajul celulelor purtătoare de antigen	100 %	0,1—30 %
Durata persistenţei	indefinită	limitată
Efectul anticorpilor antivirali	absent	vindecă infecţiile cronice
Răspuns la suprainfecţia cu virus omolog	rezistenţă	susceptibilitate
Producţia de interferon	absentă	prezentă

— cînd investigaţiile histopatologice ale ţesuturilor infectate relevă acumularea intracelulară a antigenului prin teste imunomicroscopice, chiar în absenţa probelor directe de infectivitate.

Rolul exact al particulelor DI în infecţiile cronice diferă în funcţie de sistemul virus-gazdă. Huang şi Baltimore (1977) au demonstrat, în cazul virusului poliomielitic, că mecanismul interferenţei constă în competiţia pentru anumite structuri-cheie din procesul replicativ, probabil polimeraza. În alte sisteme, în care deleţia genomică este mai marcată — virusul stomatitei veziculoase —, pe lîngă interferenţa în replicare intervin şi alterări în proteinele necesare fazelor finale ale maturării virale şi, în special, încapsidării.

Un fenomen asemănător a fost semnalat de Hall şi Choppin (1979) în cazul persistenţei cu virus rujeolic în PESS. Structurile componente ale virusului sînt sintetizate, dar asamblarea lor în particule mature este compromisă de absenţa unor proteine cu rol de asamblare, codificate de regiunea deletată a genomului (în speţă, proteina M — *matrix).*

Teoretic, trebuie să existe o limită tolerabilă a deleţiilor compatibile cu menţinerea infectivităţii. Se pare că această limită nu este fixată atît cantitativ, în termeni procentuali din genomul standard, cît și calitativ, vizînd anumite regiuni ale genomului. Pringle și colab. (1981) au caracterizat o regiune mutatorie a genomului VSV în care delețiile sînt mai frecvente. Virusurile ARN sînt extrem de mutabile și această caracteristică compensează privarea lor de mecanisme evolutive genetice specifice virusurilor ADN : integrarea, recombinarea etc. De aceea și diversitatea gazdelor este mai pronunțată la virusurile ARN comparativ cu virusurile ADN. Primele se pot replica la plante, vertebrate și nevertebrate și generează mai frecvent infecții persistente.

Rolul inhibitor specific al particulelor DI asupra replicării virusurilor din care sînt derivate a stimulat cercetări pentru determinarea efectului protector al administrării particulelor DI în boli experimentale la animal. Rezultatele contradictorii raportate de Holland și colab. (1979) au fost interpretate în sensul unui efect imunogen al stocurilor cu particule DI și nu al interferenței.

În concluzie, sinteza particulelor DI reprezintă un mecanism integrat replicării virale, programat în vederea autolimitării infecției. Chiar în absența mecanismelor de apărare imune sau nespecifice ale gazdei, sinteza particulelor DI previne epuizarea substratului și, prin aceasta, însăși extincția virusurilor. Totodată, prezența particulelor subgenomice în cele mai multe preparate virale explică modul cum agenți ai unor boli acute pot determina infecții cronice.

9.2.2. IMPLICAREA MUTANTELOR VIRALE ÎN INFECȚIA PERSISTENTĂ

În teorie, orice factor capabil să tulbure echilibrul constituit prin dominanța unui anumit tip de genom într-o populație virală poate promova persistența virală prin inițierea variației antigenice, difuziunea și replicarea în organe sau țesuturi diferite, rezistența la interferența prin particule DI etc. Un astfel de factor este reprezentat de emergența mutantelor virale, din nou, mai frecvente la virusurile ARN.

Există mutante specializate, cu defect genomic implicînd numai o anumită genă, și mutante condițional-letale (nespecializate), cu defect genomic mai larg. Ambele categorii au fost menționate în legătură cu relațiile virus — celulă-gazdă de tip permisiv, semipermisiv și nonpermisiv. Variația gradului de permisivitate conduce la instalarea persistenței virale. Între mutantele nespecializate cităm : mutante cu dimensiuni sau morfologie a plajelor modificate, mutante cu spectru de gazdă alterat, mutante dependente de temperatură etc. Prezentăm cîteva exemple de implicare a acestor mutante în persistența virală.

La paramyxovirusuri există deosebiri în spectrul de gazdă al diferitelor mutante virale în funcție de susceptibilitatea glicoproteinelor la clivajul proteolitic exercitat de proteazele gazdei. Tulpinile virulente se pot replica în diferite țesuturi, pentru tulpinile nonpatogene puține țesuturi sînt susceptibile. De exemplu, la infecția oului de găină embrionat cu virusul bolii Newcastle pe calea membranei corioalantoidiene, numai variantele patogene produc cu regularitate titruri înalte. Membrana corioalantoidiană conține celule derivate din endo-, exo- și mezoderm. Toate celulele sînt permisive pentru variantele patogene, în timp ce, pentru variantele atenuate, numai endodermul este permisiv. Variantele atenuate inițiază frecvent infecții cronice.

Mutantele sensibile la temperatură *(ts)* nu se replică la temperatura nonpermisivă (de regulă, supraoptimală). Fenotipul parental, sălbatic, se replică atît la temperatura optimă, cît și la cea nonpermisivă. Nagay și Yoshida (1984) au propus următoarea secvență a evenimentelor pentru instalarea persistenței virale în cazul paramyxovirusurilor. Obișnuit, o infecție persistentă se inițiază *in vitro* cultivînd o mică fracțiune de celule care supraviețuiesc infecției letale acute cu fenotipul sălbatic. Această fracțiune este rezultatul protecției exercitate de particule DI, totdeauna prezente în stocurile de virus sălbatic. Însă, în cursul pasajelor succesive, celulele infectate cronic suferă de obicei crize litice, ceea ce indică rolul insuficient al particulelor DI în menținerea persistenței. Pentru asigurarea echilibrului culturilor purtătoare intervin mutantele *ts* care sînt de regulă slab citopatogene, se multiplică chiar în absența fenotipului sălbatic și, mai mult, interferează cu acest fenotip. Odată apărute, mutantele *ts* tind să înlocuiască fenotipul virulent din populația virală, asigurînd stabilitatea liniei celulare cronic infectate. Într-adevăr, Ogura și colab. (1981) au arătat frecvența mutantelor *ts* în culturile purtătoare. Această ipoteză în două secvențe permite cuplarea mecanismului prin particule DI cu cel prin mutante *ts* în explicarea inițierii, respectiv menținerii culturilor persistente.

Mutantele *ts* intervin în menținerea infecțiilor cronice și indirect, prin intermediul inducției interferonului. Sekelick și Marcus (1979), studiind patogenia infecției cronice cu VSV, menționează inducția interferonului de către mutantele *ts* ca mediator al protejării celulare. În timp ce virusul sălbatic este un inductor slab de interferon, mutantele pot fi inductori buni, ceea ce temperează alura acută a infecției. Mai mult, interferonul modelează însăși infecția cu mutantele *ts* și, odată cu aceasta, rata revertanților la fenotipul virulent. Danielescu și colab. (1982) au argumentat rolul mutantelor *ts* ale virusului herpetic în inițierea transformării celulare. S-a confirmat astfel activitatea transformantă a mutantelor *ts* prin inocularea celulelor permisive cu virus activ la temperatură nepermisivă (MacNabb, 1974).

Recent, a apărut o explicație referitoare la insuficiența particulelor DI în mecanismul persistenței. O nouă clasă de mutante, mutantele rezistente la interferența prin particulele DI, a fost descrisă de Horodski și și colab. (1983). Apariția lor în cursul infecțiilor persistente sau a pasajelor nediluate este mai frecventă decît prin pasaje diluate care, de regulă, asigură o stabilitate pronunțată a infectivității.

9.2.3. VARIAȚIA ANTIGENICĂ

Variația antigenică este un mecanism prin care microorganismul infectant cîștigă un avantaj selectiv prin modificarea periodică a profilului antigenic, astfel încît evită eliminarea sa prin răspunsul imun al gazdei parazitate. Fenomenul a fost evidențiat atît în infecții virale, cît și în cazul multiplicării agenților din genul *Borrelia, Plasmodium* și *Trypanosoma*. Probabil că fiecare parazit poate exprima un spectru larg de antigene de suprafață iar anticorpii sintetizați de gazdă exercită un efect selectiv, permițînd replicarea persistentă a acelor variante care nu sînt neutralizate de anticorpi. Utilizarea anticorpilor monoclonali, care reușesc să discrimineze între epitopi ai aceluiași antigen, a indicat răspîndirea acestui fenomen chiar în cazul virusurilor cunoscute ca monotipice. De exemplu, Wiktor și Koprowski (1980) au arătat că variante ale virusului rabic se pot replica în prezența anticorpilor sintetizați ca răspuns la inocularea altor tulpini rabice, iar Ter Meulen și colab. (1981) au pus în evidență același fenomen în cazul virusului rujeolic.

Totuși, cel mai bun model pentru demonstrarea rolului variației antigenice în infecțiile persistente îl constituie unele retrovirusuri nononcogene la animale. Kono și colab. (1973), lucrînd cu virusul anemiei infecțioase ecvine, au pus în legătură episoadele secvențiale de hemoliză acută cu apariția unor mutante virale — în cursul infecției persistente —, care nu mai sînt neutralizate de anticorpii dezvoltați anterior. Virusul Visna al oilor produce de asemenea o infecție persistentă, dar care nu evoluează ondulant. Totuși, variante antigenice se obțin prin izolări repetate de virus în cursul infecției. Mai mult, variația antigenică a virusului Visna poate fi ilustrată și în culturi de celule, utilizînd un inocul clonat prin metoda plajelor și anticorpi monospecifici pentru imunoselecție.

Baza moleculară a „alunecării" antigenice este acumularea mutațiilor punctiforme într-o regiune specifică a genomului viral, și anume cea care codifică proteinele de înveliș. Mutațiile alterează situsurile de interacțiune a acestor proteine cu anticorpii seroneutralizanți. Evaluările actuale estimează că în interacțiunea cu anticorpii seroneutralizanți pot fi implicați 3—4 epitopi, fiecare conținînd un număr mic de aminoacizi. Astfel se poate prognoza selecția unor variante asemănătoare la animale inoculate independent. O altă presupunere logică este că răspunsul inițial în anticorpi al animalului va determina numărul minim al mutațiilor sau modificărilor necesare pentru ca o variantă antigenică să se sustragă de la acțiunea seroneutralizantă a anticorpilor. Narayan și colab. (1984), lucrînd cu virusul Visna, au arătat că anticorpii seroneutralizați cu spectru îngust selectează mai rapid variante nonneutralizabile decît cei cu spectru larg. În general, serurile hiperimune izolează rar variante antigenice.

Apariția succesivă a variantelor antigenice în cursul infecției persistente determină sinteza unor anticorpi cu spectru din ce în ce mai larg (fig. 9-2). În condițiile unor anticorpi cu spectru larg, numărul mutațiilor necesare pentru apariția unor variante noi va fi tot mai mare. Pare probabil ca mutații repetate să fie sau ineficiente în ceea ce privește eludarea acțiunii neutralizante sau letale pentru virus. Deci, singură variația antigenică nu poate perpetua infecția persistentă și alte mecanisme trebuie să intervină.

Cernescu (1982, 1986) a adus argumente privind rolul variației antigenice în patogenia PESS, neuroinfecție persistentă cu virus rujeolic. Ținînd seama de sinteza locală, în sistemul nervos central, de anticorpi rujeolici cu profil electroforetic oligoclonal se poate prognoza inducția frecventă a variantelor antigenice ale virusului rujeolic, pentru că spectrul acestor anticorpi este foarte îngust. Aceste variante eludează contro-

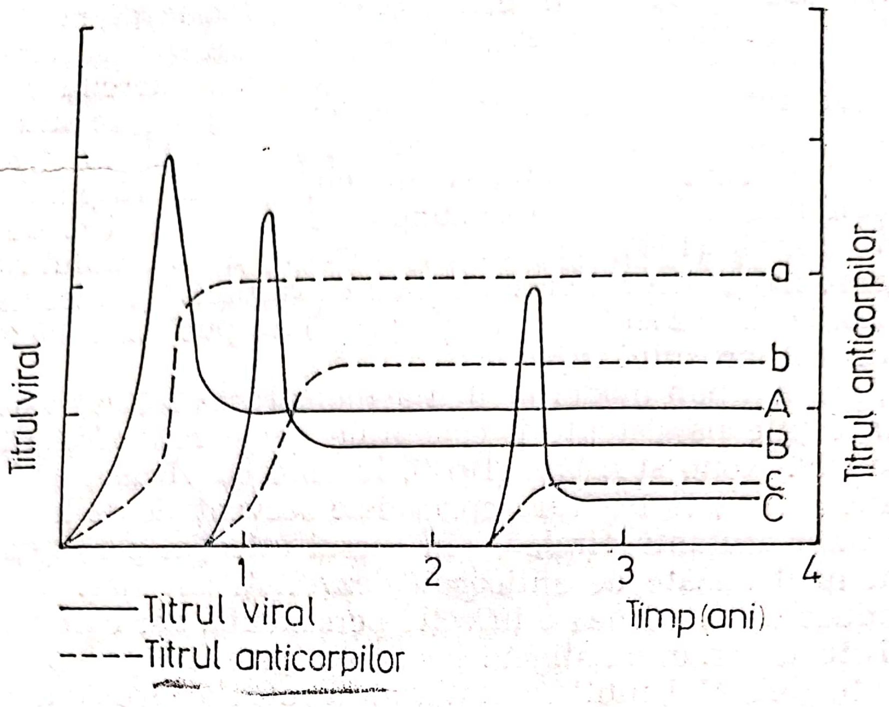


Fig. 9-2 — Apariția succesivă a variantelor virale *(A, B, C)* în cursul infecției persistente în competiție cu acțiunea presoare a anticorpilor omologi *(a, b, c)*.

lul imun al gazdei și se multiplică în continuare, determinînd deteriorarea clinică progresivă. Apariția secvențială a mutantelor antigenice constituie, astfel, o modalitate de cronicizare a infecției virale într-o gazdă imunologic-competentă.

9.3. ROLUL GAZDEI ÎN PERSISTENȚA VIRALĂ

Acțiunea citolitică sau citopatică a virusului este de primă importanță în definirea gravității infecției. În afara acestui efect direct, există o serie de reacții ale gazdei (răspunsul inflamator, răspunsul imun etc.) care determină complexitatea patologiei viral-induse în organism, *in vivo*. În unele cazuri reacțiile gazdei nu conduc la eliminarea infecției, ci la cronicizarea ei.

9.3.1. RĂSPUNSUL INFLAMATOR

Răspunsul inflamator la infecțiile virale acute este caracteristic compus din celule mononucleare. Dezvoltarea lui completă depinde de conjugarea cu evenimente imunospecifice și, în special, de prezența limfocitelor T sensibilizate. Celulele T sînt atît efectorii primari, cît și factorii care determină recrutarea altor mononucleare, în special macrofage și limfocite B, în focarul inflamator.

Mecanismele prin care celulele T sensibilizate recunosc și intervin în stoparea infecției virale sînt insuficient lămurite, însă două alternative au fost propuse :

— limfocitele T recirculante supraveghează continuu țesuturile și sesizează sediul replicării virale ;

— factori umorali chimiotactici eliberați de replicarea virală atrag continuu limfocitele.

În cazul în care virusurile sînt limfotrope, afectarea funcțională a limfocitelor permite cronicizarea infecției prin compromiterea răspunsului inflamator.

Pe de altă parte, evoluția virozelor la gazde cu deficite imunitare poate lua o alură cronică. De exemplu, probabil toate virusurile cu anvelopă sînt susceptibile la liză mediată de complement. Liza virală mediată de complement presupune un stimul foarte puternic al activității complementului, ceea ce se realizează prin cantități mari de anticorpi sau prin activatori direcți. Aceste condiții nu sînt întrunite în afectări specifice ale unor verigi ale complementului sau în alte stări imunosupresive.

O situație particulară este aceea a lentivirusurilor care, prin slaba lor antigenicitate, nu antrenează răspuns inflamator imun. Evoluția lentă a simptomatologiei, ca și incubația prelungită în aceste viroze au fost atribuite lipsei fenomenelor imune sau imunopatologice asociate infecției.

9.3.2. INTERFERONUL ȘI PATOGENIA PERSISTENȚEI VIRALE

Capacitatea interferonului de a inhiba virusurile *in vivo* este mai complexă decît inhibiția măsurabilă în culturi de celule, datorită prezenței diferitelor tipuri (leucocitar, fibroblastic și imun), subtipuri și amestecuri de interferoni care influențează variabil virusurile, gazda sau țesuturile gazdei. În același timp, *in vivo*, acțiunea antivirală a interferonului este susținută de alți factori ai apărării specifice și nespecifice. De exemplu, anticorpii sintetizați timpuriu neutralizează o parte din virus și prin aceasta facilitează acțiunea interferonului care nu este evidentă decît în competiție cu cantități limitate de virus.

Animalele infectate persistent au permanent un nivel scăzut de interferon în ser sau în alte umori. Gresser și colab. (1976), la șoarece, au arătat că animalele adulte infectate persistent cu virus herpetic fac recidive după administrarea anticorpilor antiinterferon iar titrul virusului în organe este sensibil mărit comparativ cu al martorilor netratați. Deci, deși scăzut ca titru, interferonul intervine în menținerea echilibrului caracteristic persistenței virale. O posibilă explicație este sugerată de fenomenul inducției stării antivirale prin transfer (SAT). SAT este deosebită de starea antivirală indusă direct prin aceea că nu depinde de concentrația interferonului și se poate produce chiar în absența contactului celulelor cu interferonul propriu-zis.

Celulele tratate cu interferon și cocultivate cu celule alo- sau xenogenice netratate transferă acestora din urmă starea antivirală. Acest tip — SAT — necesită contactul celulă cu celulă și este operant chiar în prezența a numai 10% din celule sensibilizate cu interferon. Deși procesul este inițiat de interferon, nu necesită prezența lui continuă. Importanța transferului stării antivirale pare a fi deosebită *in vivo*, mijlocind limitarea difuziunii virale în țesuturile avasculare unde interferonul seric accede cu greutate. Suprafața tractului intestinal și respirator, ochiul, epidermul sînt sedii în care SAT poate fi semnificativă. De asemenea, focarele inflamatoare populate de limfocite mobile care produc interferon alfa ilustrează ponderea stării antivirale induse prin transfer.

Interferonul are un rol important în apărarea antivirală fie acționînd direct asupra receptorilor pentru interferon ai celulelor adiacente focarului infecțios, fie inducînd starea antivirală de transfer, potențînd acțiunea diferitelor tipuri de interferon în mixturi sau sensibilizînd celulele la acțiunea interferonului („*priming*"). Producția timpurie a interferonului contribuie la realizarea latenței herpesvirusurilor. De exemplu, Jordan și Merigan (1974), studiind imunitatea celulară în infecția cu virusul varicella-zoster au arătat că bolnavii cu leziuni diseminate prezintă o întîrziere și diminuare a producției de interferon în lichidul veziculelor, comparativ cu subiecții ale căror leziuni sînt localizate. În patogenia tumorilor induse de retrovirusuri la animal, rolul interferonului a fost relevat de studiile cu anticorpi antiinterferon. Inglot și Chudzio (1977), urmărind efectul administrării imunoglobulinei antiinterferon la șoareci BALB/c inoculați cu virusul leucemiei murine Rauscher, notează agravarea și accelerarea evoluției neoplaziei splenice. Rezultatele sînt cu atît mai pronunțate, cu cît tratamentul urmează timpuriu infecției. Spumavirusurile, alte retrovirusuri, infectează persistent o varietate de specii animale. Și de la om s-au izolat tulpini de spumavirusuri, de la pacienți afectați de neoplasme. Infecțiile persistente cu spumavirusuri se produc în ciuda prezenței anticorpilor neutralizanți, probabil datorită capacității lor de difuziune prin contiguitate de la o celulă la alta. În plus, Hooks și Gibbs (1975) atribuie ușurința cu care spumavisurile produc infecții persistente faptului că ele sînt slabe inductoare de interferon și nu sînt susceptibile la acțiunea interferonului.

Un efect contradictoriu al anticorpilor antiinterferon a fost observat în infecția persistentă a șoarecelui nou-născut cu virusul coriomeningitei limfocitare. În loc să se obțină o agravare a bolii, s-a obținut ameliorarea evoluției. Gresser și colab. (1976) au propus o interpretare diferită a însăși patogeniei bolii. Leziunile produse nu sînt urmarea acțiunii litice a virusului sau fenomenelor imunopatologice (ca la șoarecele adult), ci sînt datorate producției exagerate de interferon și manifestării efectului anticelular al acestuia. În acest mod se explică întîrzierea în creștere, inhibarea diferențierii celulelor imunocompetente etc.

Interferonul imun (gamma) constituie o clasă de limfokine produsă de celulele imunocompetente în urma interacțiunii cu antigene sau mitogene. Interferonul imun este o substanță naturală imunomodulatoare cu acțiune antivirală secundară, interferonul clasic este o substanță naturală antivirală cu proprietăți secundare imunoreglatoare. Interferonul imun pare să aibă o semnificație deosebită în cazul infecțiilor cu virusuri ADN care induc mai puțin eficient interferon clasic.

Participarea interferonilor în patogenia infecțiilor virale persistente nu poate fi înțeleasă complet în afara cunoașterii rolului imunomodulator al acestor substanțe. Într-adevăr, interferonul — atît cel imun, cît și cel clasic — afectează variate verigi ale răspunsului imun :

— diminuează anticorpogeneza și numărul celulelor formatoare de anticorpi ;

— crește proporția celulelor NK și accentuează kinetica lizei ;

— modulează — în funcție de doză și moment al administrării — acțiunea diferitelor subseturi de limfocite T ;

— stimulează funcțiile fagocitare ale macrofagelor periferice etc.

În concluzie, participarea interferonilor în inițierea și menținerea persistenței virale nu se limitează numai la diferitele modalități de acțiune antivirală, ci depinde și de alte funcții biologice ale acestor substanțe, cum ar fi : acțiunea imunoreglatoare, inhibiția creșterii celulare, alterarea membranei celulare, activarea macrofagelor, exagerarea acțiunii citotoxice a limfocitelor (mai ales a celulelor NK). Ca și alte mecanisme nespecifice de apărare ale organismului, acțiunea interferonilor este revelatoare în condițiile infecției primare, cînd memoria imunologică lipsește, sau în primele faze ale infecției, cînd răspunsul imun nu este complet edificat. Prezența interferonului seric la un nivel ridicat în cursul infecțiilor persistente, faptul că cel puțin o treime din bolnavii cu neoplasme sau boli autoimune produc, prin celulele mononucleare, interferon spontan are atît semnificație patogenică, cît și valoare prognostică.

9.3.3. INIȚIEREA PERSISTENȚEI PRIN ANTICORPI SPECIFICI

Veriga efectoare a răspunsului imun limitează difuziunea virală prin mai multe mecanisme :

— neutralizarea virusurilor prin anticorpi ;

— viroliza virusurilor cu anvelopă prin complement ;

— citoliza celulelor infectate și acoperite cu anticorpi antivirali (mediată tot de complement) ;

— citoliza realizată de celule citotoxice dependentă de anticorpi ;

— acțiunea citotoxică specifică a limfocitelor sensibilizate.

De remarcat și participarea unor variate celule efectoare. De exemplu, în citoliza dependentă de anticorpi sînt operante leucocite diverse dotate cu receptori pentru porțiunea Fc a moleculei de IgG, cum ar fi : monocitele, polimorfonuclearele, subseturi din limfocite. Toate aceste celule nu trebuie activate specific ; ele reclamă numai prezența anticorpilor specifici cuplați cu antigene virus-codificate exprimate la suprafața celulelor infectate. Distribuția anticorpilor la suprafața celulelor infectate poate, totuși, în anumite condiții, împiedica acțiunea litică a celulelor efectoare ale răspunsului imun. Această alternativă a fost propusă pentru explicarea inițierii infecției persistente cu virus rujeolic în PESS.

În PESS, virusul rujeolic persistă deși subiecții au titruri de anticorpi specifici deosebit de înalte și activitate citotoxică a limfocitelor nealterată.

O posibilă explicație pentru persistență este sugerată de fenomenul imunomodulării prin anticorpi. În rezumat, acest fenomen implică următoarea succesiune (fig. 9-3) :

— legarea anticorpilor specifici la antigenele virale exprimate la suprafața celulei infectate *(i)* ;

— redistribuția polară a antigenelor virale complexate cu anticorpi prin aglomerarea într-o zonă limitată a membranei celulare *(ii)*;

— exocitoza complexelor antigen — anticorp *(iii)*;

— silențiozitatea antigenică a celulei denudate de antigenele virale superficiale, dar care rămîne infectată în continuare *(iv)*;

— reexpresia antigenelor virale în lipsa anticorpilor din anturajul celulei sau reluarea punctului *i* în caz contrar *(v)*.

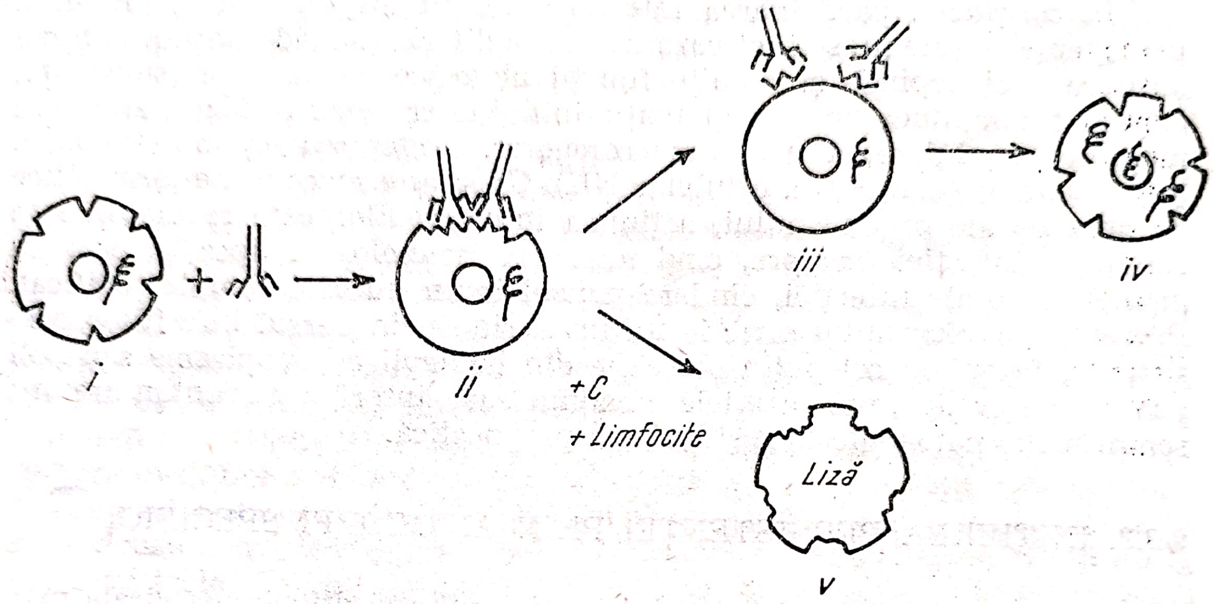


Fig. 9-3 — Imunomodularea antigenică prin anticorpi în inițierea infecției persistente (detalii în text).

Inițierea imunomodulării antigenice este posibilă în compartimentele din organism în care complementul (elementul efector al citolizei dependente de anticorpi) nu este prezent, ca de exemplu în sistemul nervos central sau ductul toracic. Este frapant că în PESS virusul rujeolic a fost izolat tocmai din creier sau din ganglionii limfatici. Cu toate acestea, imunomodularea antigenică se poate produce și în prezența complementului, pentru că elemente cantitative favorizează imunomodularea în competiție cu citoliza prin complement. Într-adevăr, un număr minim de molecule antigenice virale sînt necesare pentru imunomodulare, în timp ce liza prin complement sau limfocite citotoxice reclamă un stimul antigenic foarte puternic.

In vitro, culturi celulare cronic infectate cu virus rujeolic au putut fi obținute și menținute timp îndelungat cu mediu de cultură conținînd anticorpi antirujeolici. Oldstone și Tishon (1978), în continuarea unei serii de lucrări care urmăreau realizarea unui model *in vitro* al infecției persistente din PESS, au confirmat abrogarea citolizei imune a celulelor infectate cu virus rujeolic prin imunomodularea antigenică. Semnificația acestui model pentru afecțiunea clinică era demonstrată și de datele electronooptice care evidențiau în citoplasma celulelor imunomodulate nucleocapside virale anormal poziționate, mimînd imaginile din biopsiile de creier din PESS.

Cîteva elemente adiționale au fost obținute prin studierea în continuare a modelului *in vitro :*

1. Reexpresia antigenului după imunomodulare (vezi punctul *v)* este condiționată de timp, și anume cu cît intervalul de incubare a celulelor infectate în mediu cu anticorpi este mai lung, cu atît timpul pentru reexpresia antigenului este mai mare. O incubare prelungită peste 6 săptămîni poate suprima reexpresia (Joseph și Oldstone, 1975).

2. Extensia citolizei prin anticorpi și complement sau prin limfocite citotoxice este paralelă cu numărul celulelor inițial infectate. Imunomodularea poate limita acest număr.

3. Virusul rujeolic conține șase polipeptide structurale : hemaglutinina (HA), factorul de fuziune (FF), fosfoproteina (P), proteina nucleocapsidară (NC), polimeraza (p) și proteina-*matrix* (M). Imunomodularea afectează diferit aceste proteine, și anume :

— o suprimare drastică inițial și lentă apoi a glicoproteinelor anvelopei HA și FF ;

— perturbarea sintezei proteinelor interne în sensul diminuării cu 80% a fosfoproteinei și cu 40% a proteniei-*matrix ;*

— fosforilarea fosfoproteinei, a proteinei-*matrix* și a proteinei nucleocapsidare este variat influențată. Fosforilarea fosfoproteinei scade și a proteniei-*matrix* crește. Proteina M fosforilată se corelază cu diminuarea eliberării de virus, ceea ce este un fenomen tardiv și în PESS.

Numai anticorpii policlonali sau cei monoclonali anti-HA induc imunumodularea.

Acceptarea patogeniei PESS prin imunomodulare a fost susținută și de cîteva argumente recente obținute *in vivo.* Near și Rapp (1971) au demonstrat inițierea infecției persistente cu virus rujeolic la hamsterii sugari inoculați la naștere și hrăniți de mame imunizate antirujeolic. Albrecht și colab. (1977) au confirmat acest lucru la maimuță. Rammohan și colab. (1982) au sugerat același lucru la om, descriind un caz de PESS apărut consecutiv transferului pasiv al anticorpilor în timpul infecției rujeolice primare.

Dacă în urmă cu cîțiva ani teoriile patogenice în PESS aveau în vedere fie anomalii ale gazdei, fie ale virusului, în prezent se confruntă două opinii care *vizează* posibilitățile eludării mecanismelor imune de sterilizare imunologică a gazdei infectate. Cele două teorii sînt variația antigenică și imunomodularea. Argumente pentru prima dintre ele au fost aduse și de noi și sintetizate în subcapitolul 9.2.3. (Cernescu, 1982 și Cernescu și Popescu, 1985). În fapt, cele două opinii nu se exclud și se poate concepe un scenariu în două acte, după cum urmează.

Inițierea persistenței este urmarea variației antigenice care constituia și explicația titrurilor excesive antirujeolice și care cresc pe măsura evoluției PESS. Variația antigenică nu este un fenomen perpetuu, deoarece acumularea de mutații conduce în final la variante neviabile și la autosterilizare. Continuarea persistenței este menținută de imunomodulare care însoțește probabil stadiile finale torpide ale evoluției PESS.

O astfel de interpertare impune ca logice următoarele măsuri practice :

— evitarea administrării imunoglobulinoprofilaxiei antirujeolice, mai ales la copii mici ;

— contraindicarea terapiei imunosupresoare care limitează variația antigenică și răspunsul imun în faza inițială a PESS și recomandarea imunostimulatoarelor ;

— încercarea unei imunizări active cu hemaglutinină rujeolică în vederea limitării leziunilor imun-induse și stimulării răspunsului imun policlonal.

Deși acest cadru nu permite epuizarea discuției asupra patogeniei PESS, trebuie menționat că imunomodularea prin anticorpi este un mecanism operant și în persistența altor virusuri. Stevens și Cook (1974) l-au invocat în legătură cu latența virusurilor herpetice, deși aici lucrurile sînt mascate de faptul că herpesvirusurile induc receptori Fc la suprafața celulelor infectate. De asemenea, în infecțiile persistente induse de retrovirusurile Gross și Friend, imunomodularea a fost probată (Oldstone și colab., 1980). Unele boli autoimune în care etiologia virală a fost sugerată — miastenia gravă, diabetul juvenil, tiroiditele — implică imunomodularea receptorilor hormonali specifici la nivelul membranelor celulare. În plus, se poate prognoza că alterarea prin anticorpi a unor determinanți membranali poate genera semnale transmembranale care să influențeze genele sau expresia genelor din celule. Această alternativă poate avea semnificații clinice mult mai largi.

9.4. ASPECTE CLINICE SPECIFICE ALE PERSISTENȚEI VIRALE

Experimental, *in vitro* sau la animal, au putut fi obținute sisteme virus — gazdă în care evoluția infecției are un caracter cronic cu agenți din toate familiile virale. De un interes particular sînt sistemele care reproduc infecții cronice întîlnite în clinică. Limitîndu-ne la acest ultim aspect trebuie menționate următoarele situații :

- *Parvovirusurile*, cele mai mici virusuri ADN, sînt frecvent izolate din culturile de celule primare de origine animală sau umană pe care le infectează persistent. La animal, infecția persistentă cu parvovirusurile defective are un rol protector în cazul coinfecției cu adeno- sau herpesvirusuri. Recent descoperită este și inhibiția exercitată de parvovirusuri asupra potențialului oncogen al adeno- și herpesvirusurilor.
- *Hepadnavirusurile* infectează persistent toate gazdele naturale. La om, virusul hepatitei B determină hepatită cronică în 5—10% din cazuri la adulți și în peste 50% din cazuri la copii. În zonele endemice cu HBV s-a descris o incidență crescută a carcinomului hepatic primitiv iar fragmente din genomul HBV sînt detectate în celulele carcinomului sau în liniile celulare inițiate din tumoră.
- *Papovavirusurile* produc frecvent infecții latente la gazdele naturale. La om, două tulpini virale înrudite au fost izolate din leucoencefalopatia multifocală progresivă (LMP). LMP este o infecție demielinizantă rară, produsă de infecția persistentă cu SV40, infecție relevată de obicei în contextul unei stări imunosupresive severe.

- *Herpesvirusurile* sînt, în ciuda diversității, unite prin proprietatea de a infecta latent. Unele aspecte clinice vor fi detaliate în continuare.
- *Paramyxovirusurile*, ca și alte familii de virusuri ARN anvelopate (toga-, rhabdo-, retrovirusuri etc.), au ca element caracteristic pentru patogenia infecției persistente existența unei surse continue de antigene la nivelul celulelor parazitate în raport cu care se dezvoltă atît anticorpi antivirali, cît și autoanticorpi în raport cu structuri ale celulelor nervoase. PESS este exemplul clinic cel mai cunoscut de infecție cronică cu paramyxovirusuri (vezi subcapitolul 9.3.3.).
- *Togavirusurile* determină infecții cronice ale sistemului nervos central fie primitiv, fie secundar unor encefalite acute. Epilepsia parțială continuă Kojevnikov, ca și alte dezordini neurologice postencefalitice par a fi determinate de infecții virale cronice. O formă rară a PESS, cu evoluție mai benignă, este cauzată de virusul rubeolic.
- *Picornavirusurile* au fost implicate în ultimul timp în unele boli neurologice cronice. De exemplu, Khone și colab. (1981) au argumentat participarea poliovirusurilor în etiologia sclerozei laterale amiotrofice. Alte enterovirusuri pot determina sindroame parkinsoniene, poliradiculonevrite recurente, meningoencefalite cronice la imunosupresați.
- *Reovirusurile*. Genomul segmentat al reovirusurilor facilitează asortarea genelor, încît pot rezulta variante cu tropism și patogenitate deosebită de patologia respiratorie sau de cea enterică cunoscute obișnuit. Replicarea cronică a acestor variante în țesuturi endocrine modifică antigenicitatea acestora, conducînd la o patologie poliendocrină autoimună. Există modele animale care reproduc nanismul hipofizar sau diabetul juvenil în urma infecției reovirale.
- *Retrovirusurile* cuprind trei subfamilii : onco-, spuma- și lentivirusuri. Agenți aparținînd tuturor subgrupelor sînt importanți pentru patologia cronică umană. În continuare vor fi prezentate cîteva aspecte particulare legate de infecțiile cronice cu herpes, respectiv lentivirusuri.

Latența herpesvirusurilor. *Genul Simplexvirus.* Persistența genomului viral în ganglionii trigeminali și senzitivi ai rădăcinii posterioare a nervului spinal (dar și în sistemul nervos central) a fost amplu confirmată atît la om, cît și la animalele inoculate experimental. Din aceste sedii, virusul se reactivează periodic, producînd simptomatologia caracteristică, într-o zonă corespunzătoare primoinfecției. Sistemul imun intervine în controlul și eliminarea infecției inițiale și a reactivărilor însă, adițional, mecanisme moleculare reglatoare condiționează starea genomului viral în latență.

Rezultatele obținute cu tehnici foarte sensibile, ca hibridarea acizilor nucleici, au indicat prezența genomului herpetic reactivabil în 50—80% din ganglionii trigeminali umani analizați fără o prealabilă selecție. Fraser și colab. (1981) au detectat genomul viral în 50% din probele de creier uman provenite de la subiecți fără semne de infecție herpetică. Mai multe alternative au fost propuse privind starea fizică a genomului viral în latență:

— persistența în formă epizomală (liniară sau circularizată) ;
— integrarea în ADN cromozomial celular ;
— coexistența celor două forme menționate anterior.

În cursul latenței sînt exprimate numai o parte din funcțiile genomului viral, celelalte sînt blocate la nivelul transcrierii în ARNm. Rezultatele comunicate pînă în prezent sînt susceptibile de a fi reinterpretate datorită unor omologii între genomul viral și secvențe din genomul uman. În orice caz, majoritatea proteinelor timpurii nu sînt sintetizate. Dintre cele exprimate, proteina VCP4 are un rol critic în controlul sintezei tuturor celorlalte proteine : timpurii, întîrziate, și tardive. Tendința actuală este de a defini latența în termenii interacțiunii dintre unele gene virale și neuronale. Modificări metabolice ale organismului pot servi drept stimuli pentru deprimarea unor gene virale latente.

Genul Lymphocryptovirus. Caracteristica biologică comună herpesvirusurilor, și anume replicare activă într-un tip de celule și latență în altul, capătă în cazul virusului Epstein-Barr noi particularități. În primul rînd, numai o populație limitată din celulele epiteliale ale orofaringelui și inelului Waldeyer conțin receptori pentru EBV. În al doilea rînd, *in vitro*, explantele de celule epiteliale din zonele menționate pierd acești receptori, ceea ce pare a fi una din cauzele dificultății de a stabili o infecție productivă *in vitro* cu EBV. O altă cauză este modificarea tulpinilor virale — numai izolatele recente infectează celulele epiteliale, tulpinile de laborator pierd această proprietate. În al treilea rînd, expresia replicării virale este legată de fazele diferențierii celulare. Deși multe celule epiteliale sînt infectate cu EBV (de exemplu, în mononucleoza infecțioasă), expresia genelor virale nu este inițiată decît de anumite etape ale maturării celulare, cum ar fi sinteza de fibronectină sau keratină. Deci virusul poate rămîne latent (epizomal și/sau integrat), așteptînd semnale celulare pentru replicare. Acest fapt explică evluția asincronă a unor celule infectate în diferite stadii și, corespunzător, excreția continuă de virus, caracteristică infecției cu EBV. Infecția persistentă cu EBV depinde de incapacitatea unor celule epiteliale sau bazilare infectate de a se diferenția și de a permite replicarea virală. Factori adiționali contribuie uneori la expansiunea clonală a unor astfel de celule și la dezvoltarea carcinomului nazofaringian.

Pe de altă parte, în cazul unui curs normal al evenimentelor, EBV replicat în celulele epiteliale infectează limfocitele B cu receptori pentru virus. Celulele limfocitare mențin virusul latent și sistemul imun normal împiedică proliferarea policlonală a limfocitelor infectate. Din nou, factori externi pot altera supravegherea imună și ocazional asistăm la expansiunea mono- sau policlonală a unor limfocite virus-infectate. Consecința este producerea unor stări maligne difuze sau localizate, cum este cazul limfomului Burkitt.

Subfamilia Betaherpesvirinae. Virusul citomegalic persistă la om, latent, mulți ani după infecția inițială. O problemă de mare interes practic este reactivarea infecțiilor citomegalice latente la bolnavii imunosupresați, fie în urma unei boli sistemice, fie datorită chimioterapicelor citotoxice administrate.

Reactivarea infecției citomegalice în cursul transplantului de organ (renal cardiac, de măduvă osoasă) este însoțită de trei aspecte clinice : sindrom infecțios febril, imunosupresie cu infecții secundare cu germeni oportuniști și precipitarea reacției de rejecție. Simptomatologia survine, de regulă, la indivizii seropozitivi la data transplantului, care sînt deci infectaţi latent. Subiecţii seronegativi fac infecţia primară probabil de la grefa contaminată.

În general, infecţia citomegalică este modulată de factori celulari. Celulele în fază staţionară produc virus progen, celulele în diviziune îşi accentuează sinteza ADN, favorizînd infecţia persistentă (De Marchi şi Kaplan, 1977).

Sindromul de imunodeficienţă dobîndită (SIDA) asociat iniţial infecţiei citomegalice cronice este încă diferit interpretat. Se pune întrebarea dacă virusul citomegalic este cauza primară a imunosupresiei sau o infecţie citomegalică latentă este exacerbată de alţi factori (fie şi virali) imunosupresivi.

Infecţii cu lentivirusuri. Lentivirusurile, aşa cum am mai amintit, determină o patologie neurologică distructiv-progresivă, care evoluează lent, pe durata mai multor luni sau chiar ani, etichetată ca encefalopatii subacute spongiforme (EPSS). La om au fost descrise două entităţi : boala Kuru (endemoepidemică în anii '50 în arhipelagul Papua — Noua Guinee) şi boala Creutzfeldt-Jakob. Natural, afecţiuni înrudite la animale sînt : boala Scrapie la oi sau capre şi o encefalopatie transmisibilă la nurci.

Rezistenţa deosebită a lentivirusurilor la un spectru larg de agenţi fizico-chimici, precum şi unele proprietăţi biologice complet diferite de ale altor virusuri au determinat, pe de o parte, o anumită reticenţă în încadrarea acestor agenţi între virusuri şi, pe de altă parte, etichetarea lor ca virusuri neconvenţionale.

Următoarele modificări histopatologice majore sînt comune la om şi la animal :

— pierderi neuronale severe şi degenerescenţă vacuolară ;
— proliferare glială (astrocite, microglie) ;
— modificări spongiforme în substanţa cenuşie ;
— plăci PAS-pozitive, amiloide, birefringente ;
— absenţa oricăror semne inflamatoare precum şi a demielinizării primare.

Leziunile prevalează în substanţa cenuşie, cerebelul fiind mai sever afectat decît encefalul. Similitudinea leziunilor şi a evoluţiei clinice a EPSS la om şi la animal a condus la formarea ipotezei uniciste, după care toţi aceşti agenţi sînt înrudiţi, posibil tulpini ale unui singur virus modificat în urma trecerilor pe gazde diferite (Gajdusek, 1977). De altfel, cu produse patologice recoltate de la om, EPSS au fost reproduse la un mare număr de specii : maimuţă, pisică, cobai, hamster, după perioade lungi de incubaţie variind între 8 luni şi cîţiva ani. În tabelul 9-II sînt redate duratele incubaţiei bolilor naturale şi experimentale.

Demonstrarea etiologiei virale a bolii Creutzfeldt-Jakob a delimitat un nou capitol în patologia neurologică : demenţe presenile transmisibile. Dintre factorii care pot influenţa incidenţa bolii Creutzfeldt-Jakob o atenţie deosebită trebuie acordată transmiterii iatrogene, riscului profesional şi antecedentelor pacienţilor.

TABELUL 9-11

Durata perioadei de incubație și a bolilor naturale și experimentale determinate de agenții EPSS (în luni)

Boala	Kuru	Creutzfeld —Jakob	Scrapie	Encefalopatia nurcilor
Naturală — incubație	60	?	24—60	?
— durată	3—12	3—36	2—6	1—2
Experimentală — incubație	1—101	10—71	14—65	11—33
— durată	1—11	1—5	2	1

În cazuistica lui Masters și Richardson (1978), istoricul medical sau cel chirurgical au fost documentate la peste 300 de bolnavi, ceea ce reprezintă 30% din cazuri. De exemplu, boala a fost transmisă consecutiv unor grefe de cornee, prin aplicarea unor electrozi stereotactici contaminați etc. Singurul argument al transmiterii interumane a bolii este transmiterea iatrogenă. Personalul medical trebuie avizat asupra rezistenței neobișnuite a agențiilor EPSS la metodele obișnuite de antisepsie. Metodele de dezinfecție care reușesc să inactiveze complet infectivitatea sînt autoclavarea (30 min la 120°C), periodatul de sodiu (10 mM), hipocloritul de sodiu 5%, fenolul 10%, permaganatul de potasiu (1 : 250 la 1 : 1 000).

Evoluția prelungită a EPSS se datorește particularităților replicative ale acestor agenți care par a fi lipsiți de acid nucleic. Prousiner (1982) a propus ca mecanism de perpetuare autoreplicarea unor fragmente de membrană modificată, etichetînd unitatea infectantă „prion". Chiar dacă unitatea replicativă ar fi acidul nucleic, dimensiunile sale trebuie să fie extrem de mici, între 3—500 de nucleotide. În virusologia plantelor sînt cunoscuți astfel de patogeni subvirali care conțin ARN în cantitate infimă și sînt lipsiți de proteine structurale. Ei au fost numiți viroizi și prezintă similitudini cu virusurile neconvenționale.

Antigenul delta asociat HBV este o particulă virală defectivă cu numai 1 700 de baze în genomul ARN și care reclamă coinfecția HBV pentru replicare. Acest agent oferă de asemenea analogii cu virusurile neconvenționale.

Infecții persisente cu retrovirusuri oncogene. Replicarea retrovirusurilor se însoțește de reverstranscrierea genomului ARN viral într-o copie ADN care se inserează în cromozomii celulei-gazdă. Celulele transformate de retrovirusuri conțin totdeauna copii ale genomului viral, dar situsul lor de inserție este întîmplător. Aceasta sugerează că, împreună cu informația virus-codificată, alți factori ce țin de mediu sau de fiziologia celulei-gazde intervin în transformarea malignă.

În cele mai multe cazuri, retrovirusurile oncogene determină transformarea malignă în proporție de 100% din celulele infectate ; o singură genă virală — oncogenă — fiind suficientă pentru transformare. Proteinele codificate de oncogene au fost atent studiate, funcția lor relevînd aspecte importante pentru etiologia cancerului. De exemplu, oncogena virusului sarcomului Rous, numită v-*src*, codifică o proteină asociată citoscheletonului care fosforilează resturile de tirozină din proteinele constitutive ale microfilamentelor. Una dintre aceste proteine — vinculina — este asociată plăcilor de adeziune de la nivelul membranei celulare implicate în inhibiția de contact. Vinculina fosforilată este inactivă, și de aici creșterea necontrolată a celulelor transformate. Alte oncogene codifică factori de creștere : oncogena v-*sis* a virusului sarcomului simian codifică factorul de creștere plachetar (PDGF).

Studiul celulelor canceroase umane a indicat prezența unor secvențe ADN omoloage oncogenelor virale. Nu numai celulele canceroase conțin astfel de gene, ci și cele normale. Protooncogenele sînt secvențele ADN similare cu o parte din secvența unor oncogene prezente în celulele normale. Oncogenele celulare sînt secvențele ADN similare oncogenelor virale din genomul celulelor canceroase care pot adesea transforma celulele *in vitro*. Aceste precizări au furnizat argumente consistente cu teoria virală a cancerului propusă de Huebner și Todaro. După acești autori, oncogenele virale provin din genele celulelor normale care au evoluat ca elemente genetice mobile.

Spre deosebire de oncovirusurile animale, în genomul virusurilor leucemiei umane cu celule T (HTLV) nu au fost descrise oncogene virale similare oncogenelor celulare și nici integrarea lor în genomul celular. Totuși, mecanismul acțiunii lor trebuie să fie asemănător și există argumente privind implicarea unor oncogene celulare în cancere umane. Cel mai consistent argument se referă la hiperexpresia unui oncogen celular prezent în mod normal în celulele tumorale. Gallo și colab. (1982) au evidențiat hiperactivitatea genei c-*sis* în patru linii sarcomatoase și în trei din cinci linii inițiate din glioame.

Semnalarea acestor date în legătură cu infecția persistentă cu retrovirusuri este oportună pentru indicarea unor modalități specifice de integrare a genomului viral în cel celular. În primul rînd, copia ADN reverstranscrisă a genomului retroviral (ADNc) se comportă ca element genetic mobil care se poate integra în diferite secvențe ale genomului celular. În al doilea rînd, aceste elemente integrate, numite *provirusuri*, se comportă ca gene celulare normale care, între altele, pot fi transmise în linie germinală descendenților. Și în mod natural, dar și experimental (prin infecție deliberată cu retrovirusuri), informația virală poate fi transmisă de la o generație la alta și în absența elementelor infectante propriu-zise. Cu alte cuvinte, retrovirusurile au două forme majore de existență : integrate ca provirusuri sau ca virusuri autonome infectante. Și într-o formă și în alta ele se pot comporta ca elemente genetice mobile.

Încă din 1969, Temin a preconizat că originea unor virusuri poate fi în însăși genomul celular, sub forma unor elemente genetice mobile care se autonomizează (Nicolau, 1967). În 1984, avînd la dispoziție cantitatea imensă de informații oferite de tehnologia ADN recombinant în clonarea onocogenelor, Temin a propus o serie de intermediari evolutivi între elementele genetice mobile și retrovirusuri, trecînd prin provirusuri. Mai mult, însăși retrovirusurile cuprind grupe evolutive, și anume : retrovirusuri nononcogene, lent-oncogene și rapid-oncogene.

În concluzie, retrovirusurile pot fi considerate ca provenind din elementele genetice mobile celulare însă și relația inversă este posibilă și constituie un caz particular de persistență virală. Important din punct de vedere teoretic este faptul că inserarea elementelor genetice mobile (sau a provirusurilor) într-un loc sau altul al genomului celular este urmată de inactivarea sau activarea unor gene celulare. Astfel de activări, consecință a controlului exercitat de un nou promotor, pot fi la originea unor tumori canceroase.

Bibliografie selectivă

ALBRECHT P., BURNSTEIN T., KLUTCH M. J. — Science, 1977, 195, 64.
BEAN W. J. jr., SIMPSON R. W. — J. Virol., 1976, 18, 365.
CAJAL N., BABEȘ V. T. — Seminarul cu tema „Hepatitele virale“, Institutul Șt. S. Nicolau, 1978.
CERNESCU C. — Rev. Roum. Méd., Virol., 1982, 33, 257.
CERNESCU C., POPESCU L. — Rev. Roum. Méd., Virol., 1985, 36, 155.
DANIELESCU G., BABA C., CAJAL N. — Rev. Roum. Méd., Virol., 1982, 33, 9.
DE MARCHI J. M., KAPLAN A. S. — J. Virol., 1977, 23, 126.
FENER J. F., WHITE D. O. — Medical Virology, ed. a II-a, Academic Press Inc., New York, 1976.
FRASER N. W., LAWRENCE W. C., WROBLEWSCA Z. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78, 6 461.
GAJDUSEK D. C., GIBBS C. J. jr. — Science, 1969, 165, 1 023.
GAJDUSEK D. C. — Science, 1977, 197, 943.
GALLO R. C., MANN D., BRODER S. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, 79, 4 680.
GRESSER I., TOVEY M. G., MAURY C. și colab. — J. Exp. Med., 1976, 144, 1 346.
HOLLAND J. J., GRABAN E. A., JONES E. L. — Cell, 1979, 16, 495.
HOLLAND J. J., SPINDLER K., HORODSKI F. și colab. — Science, 1982, 215, 1 577.
HOOKS J. J., GIBBS C. J. — Bacteriol., Rev., 1975, 39, 169.
HORODSKI F., NICHOL S. T., SPRINDLER K. R. și colab. — Cell, 1983, 33, 861.
HUANG A. S., BALTIMORE D. — Comprehensive Virol., 1977, 10, 73.
INGLOT A. D., CHOPPIN P. W. — Arch. Virol., 1977, 55, 67.
JORDAN G. W., MERIGAN T. C. — J. Infect. Dis., 1974, 130, 495.
JOSEPH B. S., OLDSTONE M. B. A. — J. Exp. Med., 1975, 142, 864.
KOHNE D. E., GIBBS C. J., WHITTE L. — J. Gen. Virol., 1981, 56, 223.
MacNABB J. C. — J. Gen. Virol., 1974, 24, 143.
MASTERS C. L., RICHARDSON E. P. — Brain, 1978, 101, 353.
NAGAY Y., YOSHIDA T. — Nagoya J. Med. Sci., 1984, 46, 1.
NARAYAN O., GRIFFIN D. E., CLAMENTS J. E. și colab. — Infect. Immun., 1981, 32, 1 045.
NICOLAU ȘT. S. — Elemente de Inframicrobiologie Specială, Edit. Medicală, București, 1962.
OGURA H., SATO H., HATANO M. — J. Gen. Virol., 1981, 55, 469.
OLDSTONE M. B. A., TISHON A. — Clin. Immunol. Immunopathol., 1978, 9, 55.
OLDSTONE M. B. A. — Comprehensive Virology, 1979, 10, 1.
OLDSTONE M. B. A., FUGINAMI R. S., LAMPERT P. W. — Prog. Med. Virol., 1980, 26, 45.
PRINGLE C. R., DEVINE V., WILKIE M. — J. Virol., 1981, 39, 377.
PROUSINER S. B. — Science, 1982, 216, 136.
RAMMOHAN K. W., Mc FARLAND H. K., Mc FARLIN D. E. — Neurology, 1982, 32, 390.
SEKELICK M. J., MARCUS P. I. — Virology, 1979, 95, 36.
STEVENS J. G., COOK M. L. — J. Immunol., 1974, 113, 1 685.
TEMIN H. — La Recherche, 1984, 15, 192.
TER MEULEN V., LÖFFLER S., CARTER M. J. și colab. — J. Gen. Virol., 1981, 57, 375.
WIKTOR T. J., KOPROWSKI H. — J. Exp. Med., 1980, 152, 99.

10

Imunitatea virală

10.1. INTRODUCERE

Generarea răspunsului imun la indivizii expuși antigenelor străine implică o serie de interacțiuni complexe și evenimente distincte moleculare și celulare, care culminează fie prin formare de anticorpi — imunitate umorală — sau de celule limfoide specific sensibilizate — imunitate celulară. Numeroase informații, cunoștințe și concepții privind mecanismul răspunsului imun au apărut în ultimele două decenii și fiecare component al răspunsului imun, fie că este specific sau nespecific, s-a dovedit a fi candidat posibil pentru funcția antivirală *in vivo*.

În virozele naturale și experimentale, evoluția infecției este determinată de virulența agentului infectant și de capacitatea gazdei de a limita infecția. Atît răspunsul imun, cît și mecanismele naturale de apărare sînt implicate în limitarea infecției.

Răspunsul imun al organismului poate limita multiplicarea virusului prin producerea de anticorpi specifici de către limfocitele B, prin liza mediată de complement a virusurilor cu înveliș sau a celulelor infectate cu virus și „învelite" cu anticorpi specifici și prin distrugerea celulelor infectate cu virus de către limfocitele de tip T, K sau NK.

Sistemul imun este cel mai eficient mecanism de apărare al organismului și de obicei reușește să elimine agentul patogen după o perioadă scurtă de infecție ; persistența virusului după un episod acut de boală indică fie un nou mecanism de replicare al virusului care scapă răspunsului imun, fie mutația genomului viral sau un defect — adesea indus de virus — în sistemul imun, care interferează cu funcțiile sale antivirale.

Rezistența față de infecția virală este de asemenea influențată de alți factori fiziologici, ca de exemplu interferon, temperatura organismului, nutriție, hormoni. Acești factori sînt numiți nespecifici, pentru că nu au specificitate imunologică. Astfel de mecanisme sînt esența rezistenței naturale și constau din efectele protectoare combinate ale barierelor anatomice, digestiei prin fagocite și mecanismelor efectoare — complementul ; toți acești factori pot fi modificați de statusul nutrițional, de cel hormonal și de constituția genetică.

Rezistența genetică a speciei, a variantelor speciei sau individuală este atribuită unuia sau mai multor loci genetici, cel puțin în sistemul murin, situați la distanță de complexul major de histocompatibilitate. Fiecare genă de rezistență influențează infecția numai cu o anumită familie de virus, deci, din acest punct de vedere, rezistența controlată genetic se deosebește de alte mecanisme naturale de apărare ale gazdei.

Apărarea gazdei față de infecțiile virale este deci mediată de mecanisme efectoare umorale sau celulare, care acționează de obicei prin cooperare. Modalitatea prin care această rețea complexă de mecanisme operează *in vivo* nu este încă bine cunoscută. Progresele în acest domeniu vor fi aduse de observațiile modelelor experimentale și ale maladiilor umane în lumina noilor descoperiri ale imunologiei fundamentale și de datele noi obținute odată cu purificarea subpopulațiilor de celule și a factorilor subcelulari ai imunității. Analiza eficienței fiecărui component al răspunsului imun este dificilă, deoarece între diferitele efecte imunologice survin interacțiuni numeroase și, în plus, mecanismul de protecție al gazdei diferă în funcție de tipul de infecție virală.

10.2. MECANISME DE APĂRARE UMORALĂ

10.2.1. ROLUL SISTEMULUI COMPLEMENT ÎN APĂRAREA GAZDEI FAȚĂ DE INFECȚIA VIRALĂ

Virusurile, ca agenți etiologici ai unui număr mare de maladii infecțioase răspîndite la toate vertebratele, au determinat gazdele să dezvolte și să folosească o multitudine de mecanisme de apărare, operative la niveluri multiple și care în final să le asigure supraviețuirea. Aceste mecanisme de apărare încep de la barierele fizice — mucoase, piele — și ajung la sistemele imunologice complexe, sofisticate.

Mecanismele de apărare umorale au funcția să neutralizeze și să inactiveze virusurile. Sistemele umorale nu operează singure *in vivo*, ele fiind coordonate și integrate cu alte sisteme de apărare specifice și nespecifice.

Între sistemele de apărare umorale care previn sau limitează infecția prin neutralizarea infectivității virale, sistemul complement joacă un rol important. Sistemul complement („C") activat este capabil să medieze o serie de activități biologice, dintre care cea mai cunoscută este capacitatea de a media distrugerea litică a celulelor, bacteriilor și virusurilor cu membrană lipidică.

Sistemul „C" activat facilitează interacțiuni cu celule efectoare variate care includ leucocitele neutrofile, monocitele bazofile, mastocitele și limfocitele. În funcție de celula efectoare implicată, sistemul „C" poate declanșa eliberarea de histamină și de alți mediatori secundari, stimulează metabolismul oxidativ, activează procesele intracelulare, inițiază migrarea dirijată a leucocitelor, facilitează fagocitoza și modulează răspunsurile imune. Deși sistemul „C" mediază numeroase acțiuni *in vitro*, cel mai important rol *in vivo* în boli, inclusiv viroze, este probabil legat de capacitatea sistemului de a produce un răspuns inflamator acut care are drept scop să localizeze substanța care a activat complementul.

După cum se cunoaște, sistemul „C" constă din cel puțin 20 de proteine plasmatice diferite — denumite componenți sau factori — care trebuie să fie activați ca să producă efecte biologice. Există două căi de activare — clasică și alternativă — care converg la etape ce implică pe C3, după care au comun următoarele secvențe de activare. Calea clasică este declanșată de anticorpi din clasa imunoglobulinelor G și M în complex cu antigenele specifice sau poate fi declanșată în absența anticorpului de un număr de substanțe extrem de diferite în compoziția fizicochimică, dintre care fac parte și unele virusuri. Calea alternativă, descrisă inițial ca sistemul properdinic, este activată direct de o serie de substanțe incluzînd anumite virusuri și bacterii. Deși activarea sistemului „C" survine în absența anticorpilor, anticorpul specific crește activarea și reactivitatea biologică.

Calea de atac a membranei începe după clivajul lui C5 de către enzimele care sînt activate, fie pe cale clasică sau alternativă. Proteinele C6, C7, C8 și C9 împreună cu C5 clivat formează un complex multimolecular, numit complexul de atac al membranei. Acest complex are capacitatea să lizeze membranele care conțin lipide.

Virusurile și celulele infectate cu virusuri și învelite cu anticorpi se comportă ca și complexe imune tipice și activează sistemul „C" (Sissons și Oldstone, 1980). Anticorpul poate fi specific indus de antigen, anticorp antiviral „natural" sau anticorp care reacționează încrucișat (Beebe și colab., 1983). Unele virusuri, în absența anticorpilor, au proprietatea de a activa calea clasică sau alternativă a sistemului „C" (Cooper, 1979). Retrovirusurile pot declanșa calea clasică, activatorul fiind reprezentat de o proteină de înveliș a virusului denumită pE15, care se leagă cu mare aviditate și activează pe C1 (Bartholomew și colab, 1978) ; virusul Sindbis, în absența anticorpului, poate activa fie calea clasică, fie cea alternativă (Hirsch și colab., 1980) ; virusul maladiei Newcastle activează calea clasică și virusul Epstein-Barr activează calea alternativă. Puține virusuri au fost studiate pentru această proprietate, dar probabil că, în continuare, cercetările vor demonstra că și alte virusuri pot activa direct, în absența anticorpului, sistemul „C".

Toate modelele experimentale în care s-au folosit celule infectate cu virusuri, cu o singură excepție, activează calea alternativă (Norley și Wardley, 1982).

Modificări ale virusurilor produse de celula-gazdă care influențează inactivarea virusurilor prin sistemul „C". Proprietățile de suprafață ale unui virus cu înveliș sînt modificate de celulele în care cultivă. Aceste modificări induse de celula-gazdă se datoresc asimilării de lipide, glicolipide, carbohidrați și uneori proteine de origine celulară în învelișul viral (Klenk și colab., 1972). Sensibilitatea virusului față de inactivarea neimună dependentă de „C" este influențată de substratul celular pe care cultivă. Astfel, virusul coriomeningitei limfocitare benigne este inactivat de serul proaspăt neinactivat, cînd este cultivat pe fibroblaste de embrion de găină, și devine rezistent cînd este cultivat pe celule HeLa (Welsh, 1977). S-au găsit diferențe marcante în susceptibilitatea virusului stomatitei veziculoase la inactivare și liză prin ser uman, în funcție de substratul celular pe care a fost cultivat (Bendinelli și colab., 1974).

Deși nu s-au făcut cercetări pentru virusuri, factorii implicați în susceptibilitatea virusurilor cu înveliș de liza indusă de sistemul „C" sînt determinați probabil de compoziția lipidică a structurii externe virale.

Cercetări interesante în acest sens au fost făcute cu lipozomi — vezicule lipidice sintetice obținute cu combinații variate de fosfolipide (Inoue și colab., 1971) ; s-a constatat că lipozomii preparați cu lecitină erau mai repede lizați decît cei conținînd sfingomielină iar lipozomii obținuți cu fosfolipide — cu acizi grași cu lanțuri lungi — erau mai puțin sensibili față de liza mediată de sistemul „C“.

Mecanisme implicate în inactivarea virusului de către sistemul „C“. Dintre mecanismele nelitice, un rol important în inactivarea virusului îl prezintă acumularea de proteine ale sistemului „C“ pe învelișul viral, care pot interfera cu absorbția sau cu penetrarea virusului în celulă, reducînd astfel infectivitatea (Berry și Almeida, 1968). În special componenții sistemului „C“ cu număr mare de molecule (Clg, C4b și C3b) maschează situsurile necesare pentru atașarea virusului la suprafața celulelor potențial sensibile.

Un alt mecanism nelitic prin care sistemul „C“ inactivează virusurile este agregarea. Cercetări cu componenți izolați ai sistemului „C“ și virusul polyoma au arătat că formarea de structuri interrețelate *(cross-linking)* era o proprietate a lui C3b, pentru care virusul posedă receptori localizați la nivelul suprafeței virale (Oldstone și colab., 1974).

Mecanismele litice intervin cînd sistemul „C“ este activat de virusuri cu învelișuri care au lipide celulare înglobate în această structură. Cercetările de microscopie electronică au demonstrat că modificările structurale rezultate din acțiunea sistemului „C“ pot fi de la distrugeri minore, pînă la pierderea integrității virale. Aceste modificări de permeabilitate permit liza osmotică sau influxul de proteine plasmatice și nucleaze în interiorul virusului.

Modificări mai extinse duc la pierderea învelișului și la eliberarea acidului nucleic viral, care își poate reține integritatea cînd este încă înconjurat de capsidă sau de proteine interne sau poate fi degradat, depinzînd de sensibilitatea proteinelor capsidale și a acidului nucleic față de enzimele și nucleazele plasmatice (Welsh, 1976). O serie de virusuri sînt sensibile la liza mediată de sistemul „C“ : retrovirusuri, myxovirusuri, paramyxovirusuri și alphavirusuri.

Activarea sistemului „C“ direct de către virus sau prin intermediul anticorpilor crește eficiența răspunsurilor specifice și nespecifice ale organismului. Astfel, clivarea lui C3, care caracterizează activarea sistemului „C“, facilitează interacțiunea antigenelor virale cu celulele efectoare, avînd astfel consecințe asupra infectivității virale. Produsele de clivaj ale lui C3 și C5 au numeroase activități biologice care produc o reacție inflamatoare acută ce localizează agentul infectant influențînd diseminarea. Factorii C3 și C5 au funcții imunoreglatoare care pot modula anumite reacții celulare. Sistemul „C“ crește activitatea neutralizantă a anticorpilor și, uneori, este necesar pentru inactivarea imună a virusurilor.

10.2.2. RĂSPUNSURILE IMUNE UMORALE FAȚĂ DE ANTIGENELE VIRALE

In cursul multiplicării virale se sintetizează diferite antigene virale, care includ componentele structurale ale virionului și enzimele virale.

Deși există numeroase informații cu privire la răspunsurile imune umorale față de virusuri nu se cunoaște încă precis dacă antigenele virale sînt timo-dependente sau independente. Teoretic, determinantele antigenice structurate ale virionilor, fiind formate din unul sau cîteva polipeptide care se repetă, dacă se găsesc în relații spațiale corespunzătoare, pot interacționa cu celulele B fără să fie necesară colaborarea cu celulele T. Date limitate asupra dependenței de limfocitele T a antigenelor virale provin din experiențe cu virusuri ARN sau ADN inoculate la șoareci atimici congenital — șoareci nuzi (Burns și colab., 1975). S-a constatat că șoarecii atimici dau răspunsuri în anticorpi după infecții cu virusul Coxsackie B1, virusul stomatitei veziculoase și virusul Sindbis, identice cu cele obținute la șoarecii normali. Nu s-au observat însă răspunsuri imune umorale la șoarecii atimici după ce se inoculează virusul gripal PR/8, virusul simian 5, virusul Sendai, urlian, adenovirusul murin și virusul herpes simplex de tip 1. Deci, rezultatele sugerează că răspunsurile imune față de picornavirusuri, rhabdovirusuri, togavirusuri sînt timo-independente, în timp ce răspunsurile față de orthomyxovirusuri, paramyxovirusuri, parvovirusuri, adenovirusuri și virusul herpes simplex sînt dependente de limfocitele T.

Răspunsul umoral la animalele mature. În infecțiile virale naturale, doza infectantă constă adesea din cîteva particule, a căror masă antigenică este extrem de mică comparativ cu numărul de molecule antigenice folosite de imunolog. Multiplicarea virusului survine înainte de a exista o cantitate suficientă de antigen pentru stimularea mecanismelor producătoare de anticorpi. Doza antigenică crește însă în timpul perioadei de producere a anticorpilor și rezultatul este un răspuns combinat, primar-secundar. Sînt diferențe importante în răspunsurile animalelor față de prima expunere la un antigen *(răspuns primar)* și reexpunerea ulterioară *(răspuns secundar)*. Cu antigenele particulate și care se replică, sinteza anticorpilor durează cîteva zile și este aproape imposibil să se obțină un răspuns primar „pur", fapt care este valabil și pentru dozele mari de antigene care nu se replică.

În general, introducerea parenterală a unui antigen la un animal este urmată de o fază inductivă a sintezei de anticorpi, care durează o perioadă variabilă între 2 pînă la 14 zile, uneori chiar mai mult, factorii determinanți fiind natura și doza antigenului precum și specia animalului. Această fază inductivă este urmată de producerea unei cantități limitate de anticorpi, care la om și la alte cîteva specii de animale sînt de tip IgM. După reexpunerea față de antigen, apare răspunsul secundar, care se caracterizează printr-o perioadă de inducție mai scurtă, printr-o cantitate mai mare de anticorpi și care, în majoritatea lor, sînt de tip IgG și IgM. Capacitatea de a răspunde în această manieră accelerată persistă probabil toată viața, deși în absența restimulării această memorie imunologică se pierde treptat.

Imunitatea la făt și la nou-născuți. Imunitatea la făt și nou-născuți reprezintă o problemă deosebită, din cauza importanței infecțiilor congenitale produse de virusuri.

Majoritatea animalelor se maturează din punct de vedere imunologic după naștere, factorii noi din mediul înconjurător avînd un rol important prin stimularea antigenică. Capacitatea de a produce anticorpi față de unele antigene este prezentă la multe specii încă de la naștere și chiar în viața fetală, deși rata sintezei și cantitatea produsă este mai mică decît la animalele mature. La om sinteza de IgM, și în mai mică măsură de IgG, începe cu a 12-a săptămînă a gestației (van Fusth și colab., 1965). Concentrația de IgM în serul nou-născuților este foarte mică, deoarece această imunoglobulină nu trece barierea placentară. S-a sugerat că prezența IgM în sîngele ombilical, observată prin electroforeză, este evidența prezumtivă a unei infecții intrauterine.

Răspunsuri umorale față de infecțiile generalizate. În general, după multe viroze, organismul dobîndește o imunitate pentru toată viața. Astfel după variolă, rujeolă sau febră galbenă, rezistența specifică dobîndită protejează ani de zile organismul față de o reîmbolnăvire. După alte viroze, ca de exemplu gripă, guturai, rezistența dobîndită este de foarte scurtă durată. Un număr de factori contribuie la această situație paradoxală, cei mai importanți fiind : intensitatea mai mare a răspunsului în anticorpi în infecțiile generalizate, comparativ cu virozele localizate la nivelul membranelor superficiale, și faptul că maladiile generalizate sînt produse de obicei de un singur serotip, în timp ce numeroasele variante antigenice produc infecțiile superficiale. În infecțiile generalizate, antigenele virale ajung mai repede la nivelul organelor unde se găsesc celulele producătoare de anticorpi — în special splină și ganglioni limfatici —, pe întreaga perioadă de evoluție a bolii în care răspunsul imun se modifică de la tipul primar la cel secundar. Se sintetizează o cantitate mare de anticorpi, de tip IgM și IgG, care au capacitatea de a neutraliza infectivitatea virală. Reinfecțiile cu virusuri care produc infecții generalizate sînt de obicei oprite înainte de apariția simptomelor, datorită răspunsului imun secundar care apare în perioada de incubație. Infecții abortive repetate pot avea rol în menținerea imunității active la un nivel ridicat. Dar chiar în absența unei astfel de reexpuneri, imunitatea poate persista ani de zile. Un exemplu clasic îl constituie studiul asupra rujeolei în insulele Farroe, unde epidemiile s-au succedat la intervale de 65 și 29 de ani și cazurile de boală au fost semnalate numai la cei care nu fuseseră infectați în prealabil. Date similare sînt cunoscute privind evoluția febrei galbene și poliomielitei la eschimoși și care au arătat o prezență continuă de anticorpi după 75 și respectiv 40 de ani de la îmbolnăvire.

Răspunsuri imune umorale față de infecțiile virale localizate la nivelul mucoaselor. Infecțiile superficiale ale tracturilor respirator sau intestinal induc sinteză de anticorp local de tip IgA și mai puțin de anticorp circulant de tip IgG. Producerea locală și activitatea IgA sînt responsabile pentru faptul că reinfecţia este mai puţin obişnuită după administrarea orală de vaccin poliomielitic, cu virus viu atenuat (Sabin), decît după administrarea parenterală a vaccinului inactivat (Salk), deşi ambele vaccinuri induc titruri mari de anticorpi circulanţi.

Cercetările au arătat că anticorpii de tip IgA găsiţi în secreţiile nazale umane sînt de importanţă majoră în protecţia organismului faţă de virusurile respiratorii. În infecţiile cu virusuri paragripale sau cu virusul sinciţial respirator, de exemplu, există o corelaţie pozitivă între titrul IgA din secreţiile nazale şi protecţia faţă de reinfecţie, în contrast cu nivelul IgG seric şi protecţie.

10.3. FUNCŢII ANTIVIRALE ALE ANTICORPULUI

Există cel puţin două mecanisme prin care anticorpii pot respinge o infecţie virală ; neutralizarea infectivităţii virionului şi activarea complementului care produce liza virionilor cu înveliş sau a celulelor infectate cu virusuri.

10.3.1. NEUTRALIZAREA VIRUSURILOR PRIN ANTICORPI

Prima publicaţie privind capacitatea anticorpilor neutralizanţi de a neutraliza infectivitatea virală se datorește lui Stenberg (1892). Autorul a observat că sîngele unui individ recent însănătoşit duce la dispariţia proprietăţii infectante a agentului cauzal. Cercetările au avut un caracter empiric, deoarece natura virusurilor şi a anticorpilor în acel moment nu era cunoscută. Andrews (1933) şi Burnet (1937) au cotinuat aceste studii cu virusurile vaccinal, herpetic şi bacteriofagi şi au făcut observaţii asupra parametrilor şi interpretării reacţiei, care au rămas valabile şi azi.

Ulterior, s-a făcut clasificarea anticorpilor după caracteristicile fizico-chimice (dimensiune moleculară, constantă de sedimentare) sau după antigenicitate (izo-, alo- şi idiotipică) sau după funcţiile biologice (neutralizanţi, fixatori de complement).

Studii asupra caracteristicilor fizico-chimice şi antigenice ale virusului au demonstrat o complexitate de antigene : unul sau mai multe determinante antigenice de suprafaţă, antigene interne, determinante antigenice în învelişul viral incluzînd şi determinanţi antigenici specifici gazdei. Deoarece nu toate antigenele cu un antigen viral nu duce inevitabil la neutralizare. Din punct de vedere al neutralizării, situsurile antigenice pot fi critice şi necritice.

Anticorpii neutralizanţi fac parte din cele trei clase majore de imunoglobuline : IgG, IgM şi IgA. Cronologia sintezei şi persistenţei diferitelor clase de anticorpi, la un anumit moment al răspunsului imun, este variabilă. Cercetări efectuate cu virusuri patogene pentru animale şi bacteriofagi inoculaţi la animale rezistente au arătat că atît rata sintezei, cît şi clasa de anticorpi este dependentă de doza de imunogen (Uhr, 1964 ;

Svchah și Mandel, 1962). Folosind teste de seroneutralizare, s-a constatat că doze mici de imunogen viral induc numai sinteze de IgM iar durata sintezei este foarte scurtă. Cu doze mari de imunogen se sintetizează atît anticorpi de tip IgM, cît și IgG. Sinteza de IgM se termină după o perioadă scurtă de timp, în timp ce sinteza anticorpului din clasa IgG persistă mult timp. Din cauza avidității mari a anticorpului de tip IgM, sînt indicate să se folosească alte metode serologice pentru evidențierea anticorpilor de tip IgG în serurile recoltate timpuriu în cursul procesului de imunizare. Cercetări asupra interacțiunii virus — anticorp au arătat că unele complexe virus — anticorp își pot reține infectivitatea ; după adăugarea unui al treilea component, de exemplu complementul, infectivitatea este neutralizată (Mandel, 1958 ; Notkins, 1971). Astfel de complexe virus — anticorp circulante au fost implicate în maladiile cu complexe imune (Oldstone, 1975).

O serie de fenomene pot explica mecanismul pierderii infectivității virusului după interacțiunea cu anticorpul neutralizant (Burns și Allison, 1975). Și din acest punct de vedere neutralizarea poate fi clasificată ca fiind un fenomen intrinsec, extrinsec sau pseudofenomen. În neutralizarea intrinsecă, legarea unui număr minim de molecule de anticorpi la nivelul unui situs antigenic critic al unei singure particule virale duce la pierderea infectivității. În neutralizarea extrinsecă, legarea anticorpului de situsuri antigenice „necritice“ poate, în anumite condiții, să ducă la neutralizare datorită unei interferențe sterice cu situsurile critice. In pseudoneutralizare, la concentrații echivalente a celor doi reactanți, legarea anticorpului de situsurile necritice duce la interacțiuni secundare, ca agregarea. Deși virionii individuali nu sînt neutralizați, fiecare agregat reacționează ca o unitate infectantă.

Fracțiunea non-neutralizată. O serie de cercetări au arătat că o mică fracțiune din populația virală scapă neutralizării chiar în prezența unui exces de anticorpi (Dulbecco și colab., 1956). S-a demonstrat că fracțiunea de virus care rămîne infectantă în prezență de exces de anticorpi poate fi neutralizată prin adăugarea unui anticorp specific anticorpului viral — antiglobulina. Acest rezultat implică faptul că virusul a reacționat cu anticorpul specific, dar nu a fost neutralizat (Mandel, 1978). Cercetări ulterioare arată coexistența virusului infectant cu anticorpii neutralizanți, fenomen frecvent și întîlnit la multe virusuri (virusul Visna, virusul dehidrogenazei lactice, virusul maladiei aleutine, virusul herpetic etc.). Explicația dată acestei stări de non-neutralizare a implicat fiecare component al sistemului virus — anticorp și celulă-gazdă. Unii cercetători fac o deosebire între complexele virus — anticorp sensibilizate, în care neutralizarea are loc prin intervenția unui al treilea factor — complement sau antiglobulină — și complexele virus — anticorp infecțioase non-neutralizate. Baza acestei distincții este operațională, fracțiunea non-neutralizată supusă neutralizării mediate este considerată sensibilizată, în timp ce fracțiunea care rămîne infectantă este considerată non-neutralizată.

Două mecanisme au fost propuse pentru explicarea fracțiunii non-neutralizate: *1*) agregarea particulelor virale ca rezultat al expunerii la anticorp permite ca situsuri funcționale critice să fie protejate; astfel de situsuri pot interacționa cu receptorii de la nivelul membranei citoplasmatice a celulei-gazdă și *2*) starea refractară ar fi atribuită unui mecanism fizic, și anume un obstacol steric al situsurilor critice produs prin juxtapunerea anticorpului.

Celula-gazdă a fost implicată în expresia stării non-neutralizate datorită faptului că aceleași amestecuri virus — ser — anti testate pe gazde diferite arată grade diferite de virus non-neutralizat.

Mecanisme ale fenomenului de neutralizare. Două concepții au fost propuse pentru a explica mecanismul neutralizării virale: *1*) funcția virală este negată cînd anticorpii, în număr suficient, se leagă de situsuri strategice de la nivelul suprafeței virusului și, dacă virusul este multifuncțional, fiecare funcție trebuie anihilată individual (funcțiile hemaglutinantă și enzimatică); *2*) interacțiunea cu anticorpul duce la modificări fizico-chimice necovalente care modifică capsida virală, și deci interacțiunile normale virus — celulă-gazdă (Mandel, 1976; Della Porta și Westaway, 1978; Yoshimo și Isono, 1978). Anticorpul cuplat cu antigenele de suprafață ale virusului interferează cu evenimentele timpurii ale multiplicării virale: adsorbție, penetrare și decapsidare.

10.3.2. DISTRIBUȚIA ANATOMICĂ A ANTICORPULUI ȘI PROBLEMA IMUNITĂȚII LOCALE

Infecțiile virale și vaccinurile cu virusuri vii pot induce o imunitate locală specifică în afară de răspunsul imun umoral. Primele studii au demonstrat niveluri de anticorpi în fluidele nevasculare care corelează cu rezistența la infecție a membranelor mucoase și care poate fi indusă independent de imunitatea sistemică (anticorpi circulanți). Faptul că acești anticorpi sînt produși local și sînt prezenți în multe secreții, în contrast cu concentrația relativ joasă din ser, a format baza ipotezei unui sistem imun distinct, cunoscut astăzi ca sistemul imun secretor (Tomasi și colab., 1965). Descoperirea producerii și activității locale a anticorpilor din clasa IgA a avut implicații importante în înțelegerea rolului anticorpilor în toate infecțiile care sînt localizate la nivelul mucoaselor sau au un stadiu inițial de multiplicare la acest nivel înainte de a invada organismul.

Cercetările inițiale care au demonstrat diferențe cantitative între nivelurile de IgA serică și secretoare au fost urmate de studii asupra structurii IgA izolată din cele două surse. În serul uman IgA se găsește sub forma unui monomer și doar 10—15% în formă polimerică, în timp ce IgA din secrețiile externe există în special ca un dimer. IgA secretoare, este compusă dintr-un dimer de IgA, un component secretor (greutate moleculară 70 000) și un lanț Y (greutate moleculară 15 000) (fig. 10-1). IgA secretoare este o proteină cu greutate moleculară de 400 000 și constantă de sedimentare 11 S. Sinteza locală de IgA a fost demonstrată în glandele salivare, tractul gastrointestinal, glandele mamare și alte situ-

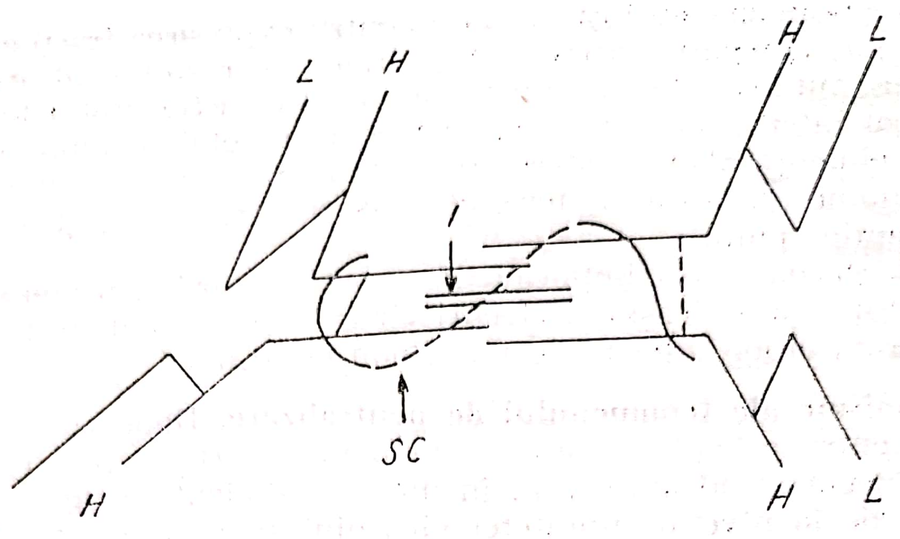


Fig. 10-1 — Model de IgA.
SC — componentul secretor ; *H* — lanțul greu ; *L* — lanțul ușor ; *J* — lanțul J.

suri secretoare la o varietate de specii. S-a găsit astfel că stroma mucoaselor duodenale și jejunale umane conține un număr mare de celule plasmatice, din care majoritatea sintetizează IgA, în timp ce un număr mic sintetizează IgG și IgM.

10.3.3. FUNCȚIA BIOLOGICĂ A SISTEMULUI IMUN SECRETOR

Activitatea antivirală. O evidență clară a rolului IgA secretoare în rezistența față de infecții s-a obținut în maladiile de etiologie virală. S-a stabilit că inducerea de anticorpi secretori specifici virali este determinată de tipul de antigen viral (viu, virulent sau atenuat și inactivat) și de calea de imunizare (parenterală sau locală). Astfel, după imunizarea cu vaccin poliomielitic atenuat sau inactivat, răspunsurile serice cu anticorpi din clasele IgM, IgG și IgA sînt similare (Ogra și Karzon, 1969). Totuși, un răspuns semnificativ cu anticorpi secretori în tractul intestinal și faringe survine numai după vaccinarea pe cale orală și durează 5 ani. Aceste cercetări, confirmate și de altele, demonstrează că imunoglobulinele secretoare cu activitate neutralizată asupra virusului produse de infecțiile naturale sau de vaccinuri sînt în special anticorpii din clasa SIgA. Titrurile anticorpilor din secreții corelează mai bine decît titrurile serice cu rezistență la infecție. În acest sens, imunitatea față de multe virusuri respiratorii care produc o maladie locală în mucoasa respiratorie este mediată de anticorpi antivirali, în special din clasa SIgA, sintetizați local.

Studiile asupra imunității care urmează fie după infecția naturală sau vaccinare au arătat că sînt două tipuri generale de infecții virale, din punct de vedere al importanței protecției serice față de protecția prin anticorp secretor. După contactul cu virusul infectant, are loc o replicare a virusului la nivelul porții de intrare, adică tract respirator sau gastrointestinal. Unele virusuri, și în special cele respiratorii, rămîn localizate la nivelul mucoasei. Anticorpul secretor indus după vaccinare orală cu vaccinul Sabin previne replicarea și pătrunderea ulterioară a unui virus poliomielitic, deci previne stabilirea stării de purtător. În al doilea tip de infecție virală (de exemplu, poliovirus, virus ECHO, rujeolic), după faza inițială de replicare la poarta de intrare urmează faza sistemică. În acest grup de virusuri, important este anticorpul circulant care previne diseminarea și localizarea virusului în organele periferice. Importanța anticorpului secretor pentru virozele din acest din urmă grup este demonstrată de faptul că un bolnav, deși imun față de infecția sistemică datorită prezenței de anticorpi serici, poate deveni un purtător cu virus persistent la poarta de intrare, în lipsa unui răspuns imun secretor. Acest lucru se întîmplă după vaccinarea subcutanată cu vaccinul poliomielitic inactivat de tip Salk.

Un exemplu de disociație posibilă între imunitatea sistemică și cea locală a fost observat după infecția cu virus sincițial respirator. Acest virus produce o bronșiolită la sugari chiar în prezență de anticorpi IgG neutralizanți transmiși de la mamă. Dacă sugarii sînt imunizați cu un vaccin administrat parenteral, deși apar cantități mari de anticorpi serici, aceștia nu conferă protecție. Paradoxal, copiii astfel vaccinați cînd se infectează cu virusul viu fac maladii foarte severe. În aceste cazuri, virusul se multiplică în plămîn în absența imunității locale a mucoasei și, dacă sînt prezente titruri mari serice de anticorpi din clasa IgG, trec la nivelul mucoasei, unde interacțiunea virus — anticorp produce în plămîn o reacție de hipersensibilitate de tip Arthus. Un exemplu asemănător este forma severă de rujeolă, adesea complicată cu pneumonie, care apare la copiii vaccinați parenteral cu vaccinul rujeolic inactivat și care ulterior sînt infectați cu virusul viu.

Imunitatea locală celulară la nivelul mucoaselor secretoare. Imunitatea mediată de celule joacă un rol important în rezistența față de anumite infecții virale. Limfocite T și macrofage, celulele care participă în răspunsul imun mediat de celule, au fost găsite în număr semnificativ în lamina proprie gastrointestinală.

În funcție de calea de imunizare, imunitatea celulară locală poate exista independent de cea sistemică.

Deci, responsabilitatea sistemului imun secretor este de a supraveghea mucoasele respiratorii și intestinale față de agenții virali și microbieni, care în marea majoritate au drept poartă de intrare în organism aceste vaste suprafețe mucoase.

10.4. RECUNOAȘTEREA IMUNOLOGICĂ ȘI MECANISME EFECTOARE ÎN MALADIILE INFECȚIOASE

Cercetările efectuate în ultimii 15 ani au adus date noi și importante în înțelegerea biologiei și funcției sistemului imun. Sistemul imun este considerat astăzi ca un sistem de cooperare și comunicare celulară, răspunsul imun față de un antigen reprezentînd suma acestor interacțiuni celulare, în care au loc controale pozitive și negative. Funcționarea sistemului depinde de o populație de celule efectoare, ajunse la stadii diferite de dezvoltare — denumite limfocitele B și T — și celule accesorii reprezentate de macrofage, celule ucigașe K (*Killer*) și celule natural-ucigașe, NK (*Natural killer*).

Celula centrală implicată în răspunsul imun este limfocitul. Studiul diferiților markeri aparținînd membranei limfocitare și activitățile lor funcționale au permis identificarea a două populații de limfocite, desemnate B și T. Divizarea celulelor limfoide în cele două compartimente funcționale ține seama de locul unde are loc maturarea lor. La păsări, pentru limfocitele B organul este reprezentat de bursa lui Fabricius, la om echivalentele bursale sînt ficatul fetal, splina neonatală și măduva osoasă.

Limfocitele T sînt limfocitele derivate sau influențate de timus în timpul dezvoltării lor.

Limfocitele B la om și majoritatea mamiferelor se caracterizează prin prezența la suprafața lor a unui receptor pentru antigen, reprezentat de o moleculă de imunoglobulină care are regiunea variabilă comună cu a anticorpului circulant.

La om primele limfocite care prezintă receptor pentru antigen sînt celule care poartă IgM sau IgG, care se dezvoltă în ficatul fetal la 9 săptămîni și jumătate de gestație. Proliferarea extensivă a acestor celule face ca la 15 săptămîni proporția de imunoglobuline prezente pe celule B să fie asemănătoare cu cea a fătului la termen. La om, ca și la păsări, secvența de maturare este deci IgM — IgG — IgA. Alte două clase de imunoglobuline sînt prezente la om (IgD și IgE), dar se cunoaște foarte puțin despre expresia sau maturarea lor în timpul vieții fetale.

În afara receptorului pentru antigen, majoritatea limfocitelor B au un receptor pentru complexele antigen — anticorp sau agregate de imunoglobuline. Receptorul este specific pentru porțiunea Fc a moleculei de imunoglobulină și este cunoscut ca receptor Fc (FcR).

Pe unele limfocite se mai poate demonstra un receptor pentru al treilea component al complementului, cu situsuri de legare distincte pentru C3b și C3d.

Un antigen caracteristic limfocitelor B umane a fost identificat cu ajutorul aloanticorpilor, antigenul fiind probabil corespunzător antigenului Ia de la nivelul suprafeței limfocitelor B murine.

Imunitatea umorală depinde de activarea de către antigen a limfocitelor B, într-o secvență coordonată de etape. Componenții esențiali ai răspunsului imun umoral sînt semnalele care produc proliferarea celulelor B (expansiunea clonală) și semnalele care induc maturarea (diferențierea) și în final conversia lor în celulele plasmatice care secretă anticorpii. Antigenul este un semnal de proliferare inițial.

Limfocitele T sînt celulele efectoare specifice ale imunității mediate de celule. Populația de limfocite T este compusă, din punct de vedere funcțional, din subclase heterogene de celule. Pe baza proprietăților lor și în special pe baza conținutului determinanților unici de la nivelul suprafeței celulare, s-au descris următoarele subseturi :

— limfocite T citotoxice (Tc), care au proprietatea de a distruge celulele-țintă purtătoare de antigene față de care au fost sensibilizate ;

— limfocite T implicate în răspunsurile de hipersensibilitate de tip întîrziat și cunoscute sub denumirea de limfocite Td, care mediază funcția imunității celulare prin intermediul unor factori solubili, denumiți limfokine ;

— limfocite T ajutătoare (Th) (*helper*), care amplifică răspunsul imun ;

— limfocite T supresoare (Ts) care limitează expansiunea clonală a celulelor B și T.

Deși există un acord general că o singură celulă T efectoare nu poate fi responsabilă de funcții imunologice atît de variate, stabilirea *in vitro* de linii clonale cu termen lung derivate din celulele T efectoare a sugerat posibilitatea că cel puțin unele celule T efectoare pot avea mai multe funcții *in vivo* (clone de celule T murine capabile de funcția *helper* mediază și hipersensibilitatea de tip întîrziat).

Markerii antigenici ai limfocitelor T permit diferențierea lor de limfocitele B și caracterizarea subseturilor diferite din punct de vedere funcțional. Limfocitele T murine posedă un marker antigenic specific, denumit antigenul Thy1, și aloantigenele Lyt, cunoscute și sub denumirea de sistemul Lyt (Lyt1, Lyt2, Lyt3). Celulele T murine pot fi divizate în trei subclase pe baza exprimării diferențiate a antigenelor Lyt. Celulele care sînt Lyt1+2—3— exprimă activitatea de *helper*, în timp ce celulele care sînt Lyt1—2+3+ conțin celule supresoare și citotoxice. O a treia populație, Lyt1+2+3+, sînt celule mai puțin mature și joacă rol reglator important în diferențierea și funcția celulelor T.

Limfocitele T umane posedă pe suprafața lor un antigen glicoproteic, denumit T3, și markeri antigenici specifici pentru subpopulațiile distincte de limfocite T, evidențiați cu anticorpi monoclonali și denumiți T4 și T8. Limfocitele Th umane au markerul T4 ; limfocitele Ts și Tc au markerul antigenic T8.

Natura receptorului pentru antigen al limfocitelor T este o problemă încă viu discutată. Ipoteze „minime“ susțin că receptorul celulei T este o moleculă de imunoglobulină ; există și alți „candidați“ care par a fi mai favorizați, și în special antigenele de histocompatibilitate și antigenele asociate genelor răspunsului imun (Ia). Următoarele observații au implicat aceste antigene ca factori de recunoaștere ai celulelor T : *1*) celulele T murine și umane nu poartă imunoglobuline pe suprafață, care ar fi ușor detectabile prin imunofluorescență ; *2*) apariția de celule Tc față de antigenele virale asociate celulei infectate este restrictivă pentru antigenul de histocompatibilitate al celulei care prezintă antigenul și *3*) cercetări recente au arătat că regiunea variabilă a lanțului H și produsele regiunii I coexistă pe celulele Ts antigen-specifice.

Limfocitele T prezintă și receptori fără specificitate pentru antigen, și anume : receptor pentru fragmentul Fc al imunoglobulinei, receptor pentru al treilea component al complementului (C3) și receptori pentru lectine.

Proprietatea majorității determinanților și receptorilor de membrană este abilitatea lor de a putea fi redistribuiți, datorită fluidității membranei. Cînd un component de membrană se combină cu molecula complementară prezintă o reorganizare independentă din punct de vedere metabolic, fiind distribuit neuniform la nivelul întregii suprafețe celulare („*patching*“), apoi un proces dependent metabolic prin care markerul este topografic redistribuit și localizat la un pol al celulei („*capping*“). Acest fenomen de „*capping*“ este de obicei urmat de interiorizarea componenților prin vezicule formate din membrana celulară.

Limfociteie T devin sensibilizate față de un antigen în țesutul periferic sau în ariile dependente de timus ale nodulilor limfatici care drenează locul unde s-a depozitat antigenul. După reexpunere la același antigen, limfocitele T sensibilizate suferă un proces de transformare, numit blastogeneză, și prezintă multiple diviziuni. Unele limfocite T care au fost supuse procesului de transformare produc mediatori solubili sau limfokine care inițiază și amplifică răspunsul imun mediat de celule.

Limfokinele sînt definite ca o familie de meditatori care nu sînt anticorpi și sînt produse de limfocitele activate de mitogene sau antigene specifice. Monokinele sînt molecule similare produse de monocite (macrofage) iar termenul mai general de citokină include mediatori eliberați de alte tipuri de celulă.

Limfokinele joacă rol important în reacțiile de imunitate celulară, cu excepția citotoxicității directe mediate de limfocitele citotoxice (Tc). Nu sînt componenți preformați și nu sînt prezente în cantități semnificative în limfocitele în stare de repaus. Limfokinele sînt sintetizate și eliberate ca rezultat al stimulării cu agenți care interacționează cu situsuri prezente la nivelul membranei celulare. Din punct de vedere chimic sînt glicoproteine și au o greutate moleculară mai mare de 10 000 daltoni. Fiecare limfokină este definită și testată în termenii activității biologice specifice asupra celulei-țintă, în majoritatea cazurilor în condiții *in vitro*. Unii cercetători au extins conceptul de limfokină pentru a include și factorii derivați din limfocitele care joacă rol ajutător (*helper*) sau supresor în brațul aferent al răspunsului imun. Deși induse de antigen, majoritatea limfokinelor eferente nu prezintă situsuri de legare specifice pentru antigen și nu necesită prezența antigenului pentru funcționarea lor. Mediatorii aferenți au însă specificitate pentru antigen, sînt restrictivi pentru genele complexului major de histocompatibilitate și acționează în special ca factori ajutători sau supresori pentru alte limfocite.

S-a descris un număr mare de limfokine (peste o sută) ; cum majoritatea au fost definite pe baza biotestărilor efectuate *in vitro*, pot să nu fie entități distincte.

Limfokinele au fost clasificate în trei grupe, și anume : *1*) factori care afectează celulele inflamatoare ; *2*) factori care distrug sau au efecte toxice asupra celulelor și *3*) factori care induc proliferarea celulară. Aceste limfokine sînt factori mitogenici, adică substanțe care induc proliferarea limfocitelor nesensibilizate. Reacția antigen specific — limfocit sensibilizat duce la producerea de limfokine cu acțiune mitogenică care, acționînd asupra celulelor nesensibilizate, duce la sinteza de noi limfokine, deci apar mai mulți factori cu acțiune mitogenică. Acest fenomen de recrutare reprezintă un mecanism *feed-back* pozitiv pentru amplificarea răspunsului limfokinelor.

Efectele limfokinelor asupra celulelor-țintă, deși extrem de diferite în termenii rolului biologic al mediatorului individual, constau totuși din cîteva acțiuni stereotipice : efecte asupra membranei celulare (mișcarea sau evidențierea receptorilor ; modificări ale motilității celulare) ; liză celulară ; stimularea celulelor de a produce limfokine ; inițierea ciclului de multiplicare celulară ; modificări fenotipice, adică maturarea limfocitelor B în celule plasmatice.

În continuare sînt date cîteva exemple de limfokine cu rol de mediatori ai imunității celulare, clasificate după celula-țintă asupra căreia acționează :

— *Mediatori care au acțiune asupra macrofagelor :*
  - Factorul de inhibiție a migrării macrofagelor (*Migration-Inhibitory Factor*, MIF).
  - Factor care activează macrofagele.
  - Factor chemotactic pentru macrofage.

— *Mediatori cu acțiune asupra leucocitelor polinucleare :*
  - Factori chemotactici pentru neutrofile, eozinofile și bazofile.
  - Factor inhibitor al leucocitelor — inhibă migrarea leucocitelor polinucleare.

— *Mediatori cu acțiune asupra limfocitelor :*
  - Factori mitogenici.
  - Factori care acționează asupra producerii de anticorpi.
  - Factor de transfer.

— *Mediatori cu acțiune asupra altor tipuri de celule :*
  - Factori citotoxici — limfotoxine.
  - Factori de inhibiție a proliferării și clonării celulare.
  - Interferon.
  - Factor care activează osteoclastele.
  - Factor cu activitate procoagulantă *(Tissue Factor)*.
  - Factor de diferențiere *in vitro* a celulelor medulare în granulocite și celule mononucleare *(Colony Stimulating Factor)*.

10.4.1. MACROFAGELE

Fagocitele mononucleare din sîngele periferic și macrofagele tisulare sînt celule accesorii cu rol important în inducerea răspunsului imun și cooperarea celulară. Acestea au capacitatea de a lega antigenele și complexele antigen — anticorp. Antigenele înglobate de macrofage sînt în parte degradate de lizozomi și doar o mică parte persistă legate de membranele celulare. Antigenul prelucrat de macrofage este prezentat celulelor imunocompetente, limfocitele B și T, devenind astfel un inductor al răspunsului imun.

Macrofagele își îndeplinesc funcția prin sinteza și secreția unor substanțe care participă la inițierea și reglarea răspunsurilor imune *in vitro*. Acest grup de substanțe includ molecule mici (prostaglandine, lizozim, hidrolaze, activator de plasminogen) cu rol în reacțiile inflamatoare și factori cu greutate moleculară mai mare, denumiți *monokine*. Aceste monokine au proprietatea de a înlocui macrofagul în procesele de activare — dependente de macrofag — a limfocitelor *in vitro*, incluzînd proliferarea celulelor T indusă de mitogene și antigene, generarea de celule T citotoxice și creșterea răspunsului în anticorpi față de antigenele dependente de timus. Monokinele au activități specifice și nespecifice antigenului. Deoarece ele au fost definite operațional pe baza sistemului de testare folosit — adică inducerea proliferării limfocitelor T, creșterea sintezei de anticorpi sau citotoxicitate față de celulele tumorale — și nu pe baza caracterelor chimice, nu se știe încă dacă diversitatea activității monokinelor este o reflecție a multiplicității factorilor sau este datorită unui singur factor cu spectru larg de funcții imunologice. O monokină care a fost foarte mult studiată este factorul de activare a limfocitelor, denumit și LAF *(Lymphocyte-Activating Factor)*. LAF joacă un rol important în activarea indusă de macrofage a celulelor T implicate în răspunsurile imune umorale și celulare și ca mijloc de coordonare a comportamentului diferitelor tipuri de celule inflamatoare.

10.4.2. CELULELE UCIGAȘE (CELULELE K) ȘI CITOTOXICITATEA CELULARĂ DEPENDENTĂ DE ANTICORPI (ADCC)

Pentru elucidarea mecanismelor imunității celulare, în ultimii ani au apărut o serie de tehnici *in vitro*. Majoritatea sistemelor studiate s-au ocupat de distrugerea extracelulară, nefagocitară a unor tipuri variate de celule-țintă. Se pot deosebi trei modele majore ale acestei citotoxicități mediate de celule.

1. Limfocitele T citotoxice pot distruge celulele-țintă după interacțiunea de contact mediată de receptori limfocitari specifici pentru antigenele de suprafață ale celulelor-țintă. Acești receptori nu sînt imunoglobuline convenționale și sînt sintetizați de celulele care le poartă. O altă trăsătură importantă a citotoxicității mediate de limfocitele Tc este restricția prin complexul major de histocompatibilitate, adică limfocitele Tc recunosc antigenele străine numai în asocierea cu antigenele *self* codificate de genele complexului major de histocompatibilitate.

2. O varietate de leucocite, incluzînd polimorfonucleare, fagocite mononucleare și unele limfocite, pot distruge celule-țintă (tumorale, celule infectate cu virus etc.) învelite de anticorpi, deci imunoglobulinele umorale servesc ca factori de recunoaștere. Acest tip de citotoxicitate mediată de celule și dependentă de anticorp se pune în evidență prin testul ADCC *(Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity)*.

3. Al treilea tip de citotoxicitate, care va fi prezentat în subcapitolul următor, se referă la citotoxicitatea mediată de celule normale limfoide care pot distruge celulele-țintă *in vitro* fără o imunizare prealabilă a donatorului de celule efectoare (celule NK).

Celulele efectoare în citotoxicitatea de tip ADCC au receptor de suprafață pentru fragmentul Fc al moleculei de imunoglobulină (FcR), care le permite să acționeze cu celulele-țintă care prezintă la suprafața lor molecule de anticorpi. Deoarece limfocitele care produc anticorpi (limfocitele B) nu sînt active în ADCC, celulele efectoare sînt dependente de factori de recunoaștere (anticorpi) produși de alte celule. Celulele efectoare în citotoxicitatea dependentă de anticorpi au fost denumite celule ucigașe *(Killer-cells)* sau celule K.

ADCC mediat de celulele K este în majoritatea cazurilor testat prin incubarea, timp de cîteva ore, a limfocitelor de la un donator neimunizat cu celule-țintă în prezență de anticorpi anticelulă-țintă. Moartea celulei-țintă este testată prin măsurarea eliberării unui marker radioactiv (^{51}Cr) din celula-țintă în prealabil marcată.

Toate celulele-țintă care exprimă antigene de suprafață și care dau naștere la răspunsuri imune umorale sînt sensibile pentru testul ADCC ; de exemplu, eritrocitele, celulele normale, celulele transformate, celulele tumorale sau infectate cu virus, bacteriile sau paraziții. Celulele-țintă variază profund în susceptibilitate, fapt care reflectă probabil diferențe față de mecanismele citolitice utilizate de tipurile de celule individualizate. Factorii care determină susceptibilitatea celulelor-țintă la ADCC includ densitatea de suprafață și stabilitatea antigenului, dimensiunea celulei și capacitatea de a repara leziunile de suprafață.

Activitatea de celulă K a preparatelor limfocitare derivate din splinele umane sau sîngele periferic este mare, în timp ce activitatea citotoxică de tip ADCC a celulelor provenite din nodulii limfatici, amigdale sau timus este mică. În sîngele periferic al adulților sănătoși, 5—10% din limfocite au potențial de celulă K, dar numărul lor variază considerabil în funcție de donator, boală, nivel hormonal etc.

Numărul și activitatea celulelor K sînt reglate în interferoni, limfokine și celulele care produc astfel de factori. Din punct de vedere al caracteristicilor de suprafață și morfologic, celulele K sînt heterogene. Celulele B și majoritatea celulelor B din sîngele periferic nu au activitate de celulă K. O fracție importantă de celule K din sîngele periferic sînt celule care poartă FcR, aparțin seriei T *(T-cell lineage)* și sînt denumite celule Tγ. O altă fracție majoră de celule K constă din limfocite de dimensiune medie, cu granulații azurofile în citoplasmă. Aceste celule sînt implicate și in citotoxicitatea naturală independentă de anticorp și poartă un antigen desemnat NK1. Depinzînd de starea lor de maturare, aceste celule poartă antigene de suprafață caracteristice celulelor T sau mieloide. Tipul de celulă K predominant în diferite sisteme variază cu celula-țintă folosită, fapt care indică un proces de selecție a celulei efectoare, determinată de structura fină a suprafeței celulei-țintă și de prezența sistemelor accesorii de recunoaștere a celulelor efectoare.

Factorii majori de recunoaștere care mediază contactele celulă efectoare — celulă-țintă sînt anticorpi de tipul IgG. În condiții optime, 50 de molecule de anticorpi *per* suprafață celulară sînt suficienți ca să producă liza, indicînd că ADCC constituie un sistem de apărare celulară foarte eficient.

Citotoxicitatea dependentă de anticorpi poate fi inhibată prin agregate de IgG, complexe imune și reagenți antiimunoglobulinici Liza celulei-țintă are loc liniar în timp și încetează după 4—6 ore, datorită saturării FcR. O celulă K omoară mai mult decît o celulă-țintă *(recycling)*, fapt care arată că interacțiunea de contact între celule, deși necesară pentru inducere, este numai un eveniment temporar. Celulele K omoară celula-țintă prin mecanisme dependente de energie similare cu acelea implicate în citotoxicitatea dată de limfocitele Tc sau celulele NK. Mecanismul fenomenului de citotoxicitate trece prin cel puțin trei faze diferite : recunoaștere, lovitură letală și dezintegrarea celulei-țintă.

10.4.3. CELULELE NATURAL-UCIGAȘE (CELULELE NK) ȘI CITOTOXICITATEA NATURALĂ MEDIATĂ DE CELULE (NCMC)

Celulele NK *(Natural killer cells)* sînt celule limfoide derivate din organele limfohematopoietice de la animale de laborator neimune și subiecți normali, care au proprietatea de a omorî celulele-țintă sensibile în absența anticorpului. Fenomenul de liză produs de celulele NK asupra unor celule tumorale, celule normale sau celule infectate cu paraziți intracelulari a fost denumit citotoxicitate naturală mediată de celule *(Natural Cell-Mediated Cytotoxicity, NCMC).*

Un efort imens s-a făcut, după descoperirea lor (1972), pentru a le caracteriza, dar pînă în momentul de față natura și funcția acestor celule nu a fost satisfăcător rezolvată.

Deși inițial au fost considerate ca celule nule, lipsite de markerii caracteristici limfocitelor B și T, cercetări recente au evidențiat o serie de caracteristici care indică relația celulelor NK cu principalele două clase de celule limfoide și macrofage.

Relații posibile cu celulele T. La rozătoare, celulele NK apar spontan la șoarecii nuzi și la șoarecii sau șobolanii timectomizați neonatal, fapt care demonstrează că nu sînt dependente de timus și nu sînt celule T tipic mature. Totuși, la șoarece și om celulele NK prezintă unii markeri care sugerează o relație cu seria celulelor T, probabil cu celulele T pretimice. Astfel, la șoarece unele celule NK prezintă markerii Thy1, Lyt1 iar la om, receptorul pentru eritrocitele de oaie (receptorul E). Deși există diferențe cantitative între celulele T și NK în exprimarea acestor markeri, ele nu pot fi suficient de largi pentru a permite separarea acestor populații de celule efectoare. Sînt și alte diferențe majore care pot fi folosite pentru discriminare, și anume rolul important pe care îl are complexul major de histocompatibilitate în citotoxicitatea produsă de limfocitele T imune și lipsa de restricție prin acest complex în citotoxicitatea naturală produsă de celulele NK.

Relații posibile cu limfocitele B. Majoritatea cercetătorilor nu au pus în evidență o relație a celulelor NK cu celulele B. Astfel, tratamentul celulelor NK cu anticorpi anti-Ig plus complement nu le modifică activitatea. Totuși, există comunicări sporadice asupra prezenței de imunoglobuline pe celulele NK. Astfel de rezultate pot fi însă atribuite și unor mici cantități de anticorpi citofili și nu prezenței receptorului imunoglobulinic de membrană.

Deosebirile importante între celulele B și NK sînt reprezentate de antigenele asociate genelor răspunsului imun care caracterizează celulele B și care nu au fost evidențiate pe celulele NK murine sau umane, cît și de absența receptorilor C3 pe majoritatea celulelor NK.

Relații posibile cu macrofage. Celulele NK murine și umane nu sînt aderente de sticlă sau nylon și nu sînt fagocitare. Aceste observații sugerează că celulele NK nu sînt monocite sau macrofage mature. Totuși, promonocitele izolate din culturi de măduvă osoasă, care în majoritate sînt neaderente și nefagocitare, au activitate citotoxică mare față de celulele-țintă sensibile față de celulele NK. Datele disponibile nu permit însă să se considere dacă aceste promonocite au sau nu aceleași proprietăți ca și celulele NK. Alți markeri de suprafață evidențiați pe celulele NK, dar care nu sînt restrictivi, sînt receptorul Fc și antigenul Lyt5, care este prezent pe majoritatea celulelor NK de șoarece, dar se găsește și la majoritatea tipurilor de celule cu origine hematopoietică.

Markerii caracteristici și posibil restrictivi pentru celulele NK, deci selectivi, sînt antigenele NK1.1., Qa4 și Qa5. Deoarece numai unele celule NK exprimă markerii caracteristici sau necaracteristici, se consideră posibilitatea unei heterogenități a acestei populații de celule efectoare.

O serie de observații au fost făcute privind relația strînsă a celulelor NK cu celulele K ce mediază ADCC. O expresie paralelă a acestor activități, asemănarea în markerii de suprafață, accentuează probabilitatea ca aceeași celulă efectoare să medieze citotoxicitatea naturală și citotoxicitatea dependentă de anticorp. După unii autori, ar trebui considerate celulele efectoare ale acestor două tipuri de citotoxicități ca celule NK/K. Deosebirea în mecanismul citotoxicității ar fi că în NCMC anticorpul armează celula efectoare, prin reacția Fc—FcR, și că multispecificitatea anticorpilor naturali conferă citotoxicității naturale polispecificitatea pentru detecția antigenului pe majoritatea celulelor cultivate. În ADCC, anticorpul reacționează cu celula-țintă înainte de a se combina cu celula efectoare prin contactul Fc — FcR.

Activitatea NK poate fi mărită prin interferon sau inductori de interferon și diminuată prin corticosteroizi. Se pare că un mecanism potent de activare a celulelor NK *in vivo* este producerea de interferon de către limfocitele T imune. Deci, celulele NK activate reprezintă un alt mecanism efector nespecific, recrutat și activat ca rezultat al răspunsurilor imune specifice mediate de limfocite.

Studiul celulelor NK a adus date noi privind bazele celulare și factorii reglatori ai imunității naturale și implicațiile acestei rezistențe neinduse, precum și rolul ei complementar sau chiar primar în apărarea organismului.

10.5. RĂSPUNSUL IMUN CELULAR ȘI ROLUL BIOLOGIC AL ANTIGENELOR MAJORE DE TRANSPLANTARE

Ca orice organ complex, sistemul imun este controlat de un număr de gene care reglează funcțiile diferitelor tipuri de celule care alcătuiesc acest sistem. Există cel puțin două sisteme genetice care reglează mărimea răspunsului imun și specificitatea lui. Aceste două sisteme genetice sînt : *1*) genele structurale ale lanțurilor grele de imunoglobulină care determină sinteza de situsuri de combinare specifice a moleculelor de anticorpi față de epitopii străini și *2*) genele complexului major de histocompatibilitate care reglează atît specificitatea, cît şi mărimea răspunsului imun.

Sistemele de histocompatibilitate murin şi uman sînt sisteme complexe, multigene, cu cel puţin trei clase de produse de genă, fiecare avînd un rol diferit în răspunsul imun. Complexul major de histocompatibilitate al şoarecelui este aşezat pe al 17-lea cromozom şi este numit complexul H-2 (fig. 10-2). Acest complex a fost divizat în patru regiuni : K, I, S şi D. Regiunile K şi D codifică pentru antigenele majore de transplantare, denumite antigene de histocompatibilitate de clasa I, care sînt glicoproteine cu greutatea moleculară de 45 000 daltoni şi sînt exprimate pe suprafaţa aproape a tuturor celulelor (exceptînd embrionul timpuriu). Regiunea I a complexului major de histocompatibilitate, denumită la început Ir *(immune response)*, codifică antigenele Ia, antigene de histocompatibilitate aparţinînd clasei a II-a, care sînt reprezentate de două lanţuri dimere, cu greutate moleculară de 34 000 şi 29 000 daltoni. Aceste antigene de histocompatibilitate sînt exprimate pe suprafaţa limfocitelor B, macrofagelor şi limfocitelor T activate şi au un rol important în cooperarea celulelor implicate în răspunsul imun.

Regiunea S a complexului major de histocompatibilitate codifică clasa a III-a de antigene de histocompatibilitate care controlează nivelul seric de beta-globulină şi complement.

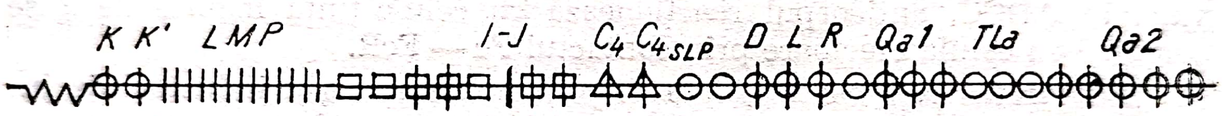


Fig. 10-2 — Diagramă sistematică a organizării genetice a complexului major de histocompatibilitate murin (H-2) (după Hugh O. McDevitt, 1984).
○ — gene MHC aparţinînd clasei I ; a — *H-2K, D, L* — polipeptide cu greutatea moleculară 45 000 daltoni, foarte polimorfe, exprimate pe toate celulele şi legate necovalent de microglobulina β_2 ; b — *TLa* şi *Qa* — polipeptide cu greutatea moleculară 45 000 daltoni, asociate cu β_{2m}, prezintă foarte puţin polimorfism şi sînt exprimate pe subseturile de limfocite T specifice ; □ — gene MHC aparţinînd clasei a II-a, exprimate pe limfocitele T şi acele subseturi de macrofage care prezintă antigenele celulelor T, ca şi pe celulele T activate ; △ — gene MHC aparţinînd clasei a III-a : componente ale fazei timpurii a căilor clasice şi alternative de activare a complementului ; ||| — *LMP* — proteine cu greutatea moleculară mică. (Relaţiile lor structurale sau funcţionale cu alte produse de gene MHC nu sînt cunoscute.)

La om, complexul major de histocompatibilitate este denumit HLA (H = *human* ; L = *leukocyte* ; A = prima regiune descrisă) şi conţine 5 gene lincate, denumite genele HLA, şi desemnate : HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D şi HLA-DR (fig. 10-3).

Complexul major de histocompatibilitate la om — HLA — este localizat pe cromozomul 6. Locii A şi B sînt echivalenţii locilor K şi D de la şoareci, iar regiunea HLA-D corespunde regiunii I.

Iniţial, genelor complexului major de histocompatibilitate (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) li s-a acordat numai rolul de a codifica antigenele care sînt ţinta respingerii grefelor. Ulterior, s-a demonstrat că antigenele de histocompatibilitate reprezintă pivotul principal de care depind toate răspunsurile imune celulare la vertebratele superioare.

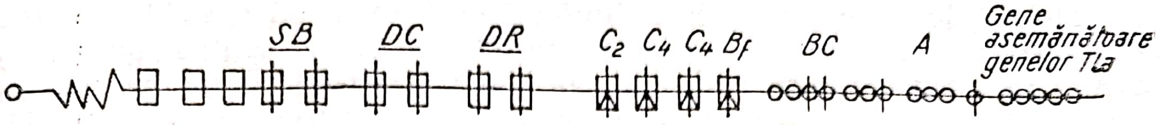


Fig. 10-3 — Diagramă schematică a organizării genetice a sistemului HLA (după Hugh O. McDevitt, 1984).

○ — gene aparținînd clasei I: a — genele HLA — *A*, *B* și *C* — poilpeptide cu greutatea moleculară 45 000 daltoni, exprimate pe toate tipurile de celule legate necovalent de microglobulina β_2 (β_{2m}), foarte polimorfe; b — gene asemănătoare TLa — polipeptide cu greutatea moleculară 45 000 daltoni, asociate cu β_{2m}, prezintă polimorfism redus, sînt exprimate pe subseturi de limfocite T specifice; □ — gene MHC aparținînd clasei a II-a: 3 molecule *(DR, DC* și *SB)*, fiecare compusă din 2 lanțuri cu greutatea moleculară 34 000 și 29 000 daltoni, exprimate pe limfocitele B și acele subseturi de macrofage care „prezintă“ antigenele celulelor T (se găsesc și pe celulele T active); |Λ| — gene MHC aparținînd clasei a III-a: componente implicate în fazele timpurii de activare a căilor clasică și alternativă ale complementului.

Cercetări efectuate începînd cu anul 1960 și pînă în prezent au permis să se explice rolul biologic al antigenelor majore de transplantare. În cursul anilor '60 s-a descoperit că diferitele clase de limfocite sînt supuse unor interacțiuni complexe în cursul desfășurării răspunsului imun. Interacțiunea dintre limfocitele T ajutătoare sau T supresoare și limfocitele B este implicată în declanșarea sau limitarea răspunsului în anticorpi față de antigenele timo-dependente și în procesul de diferențiere și proliferare a limfocitelor B, care are loc numai în prezența unui semnal ajutător furnizat de limfocitele T reglatoare (limfocitele Th și Ts). Legea care guvernează aceste interacțiuni limfocitare a fost descoperită ulterior, și anume s-a constatat că, pentru a coopera în scopul producerii de anticorpi, limfocitele B și T trebuie să aibă în comun unele antigene de histocompatibilitate, și anume antigenele de histocompatibilitate aparținînd clasei a II-a, deci codificate de regiunea I. Independent, s-a descoperit că proliferarea celulelor T ca răspuns la un antigen dat are loc numai cînd macrofagul care prezintă antigenul are comun același locus I cu limfocitul T. Deci interacțiunile limfocit T — limfocit B și macrofag — limfocit sînt specifice prin determinantele antigenice de suprafață codificate de regiunea genelor I a MHC sau regiunea echivalentă, de exemplu, la om, HLA-D. Un ultim fapt care s-a adăugat la această secvență de experimente care au legat imunitatea mediată de celule de antigenele majore de transplantare a rezultat din studiile răspunsului imun mediat de celulele T față de virusuri. S-a constatat că celulele T citotoxice, care omoară celulele-țintă infectate cu virus, își pot îndeplini funcția numai cînd antigenele virale apar pe celule care au comun segmentele H-2K și H-2D cu celulele T ale donatorului. Deci, celulele infectate cu virus sînt omorîte de limfocitele Tc printr-un răspuns imun care este restrictiv prin complexul major de histocompatibilitate. Ulterior s-a demonstrat că acest *fenomen de restricție* prin complexul major de histocompatibilitate guvernează răspunsurile imune celulare și față de alte antigene.

Toate funcțiile celulelor T care au fost testate pînă acum la șoareci, șobolani, păsări și oameni sînt restrictive pentru antigenele majore de transplantare. Această dublă specificitate pare să fie universală la vertebratele superioare. Deci, limfocitele T exprimă o dublă specificitate pentru un determinant antigenic străin (x) și pentru antigenele majore de transplantare codificate de MHC (*self*-H). Două ipoteze au fost formulate pentru a explica această dublă specificitate. Este posibil ca celulele T efectoare să posede două situsuri de recunoaștere : anti-x și anti-*self*-H sau celulele T să aibă un singur situs de recunoaștere pentru un determinant neoantigenic, format dintr-un complex de antigene x + *self*-H, cunoscut și sub denumirea de modelul recunoașterii *self*-ului alterat. Experiențe recente cu hibridoame cu celule T au dus la identificarea unei singure structuri de recunoaștere cu două lanțuri. Specificitatea de restricție față de antigenele străine, prin anumite produse de genă ale MHC, este corelată cu funcția celulelor T efectoare. Majoritatea celulelor Tc sînt în general restrictive prin produsele genelor K sau D la șoarece sau produsele A sau B a HLA. Majoritatea celulelor T nelitice, care sînt implicate în interacțiuni limfocit T — limfocit B în hipersensibilitatea de tip întîrziat, în răspunsul proliferativ față de antigenele solubile și în activarea macrofagelor, sînt restrictive prin H-2I sau HLA-D. Restricția recunoașterii celulelor T funcționale la un număr foarte limitat de componenți *self* menține probabil un echilibru între evitarea autoimunității și necesitatea răspunsului imun.

10.6. RĂSPUNSURI IMUNE CELULARE FAȚĂ DE VIRUSURI

Celulele T joacă un rol major de apărare a gazdei față de infecțiile virale acute. Orice răspuns specific al gazdei implică cel puțin două clase de celule T imune față de virus : efectori citotoxici (limfocite Tc) și inductori ajutători (limfocite Th). Limfocitele Tc omoară celulele infectate cu virus. Pentru a-și îndeplini această funcție, limfocitele Tc trebuie să recunoască antigenele virale în contextul determinantelor proprii majore de histocompatibilitate. Deci, fenomenul de citotoxicitate mediat de limfocitele Tc poate avea loc numai cînd sînt îndeplinite următoarele două condiții : celula-țintă care urmează să fie lizată trebuie să fie infectată cu virusul care a declanșat proliferarea de limfocite T și să prezinte aceleași antigene majore de transplantare aparținînd clasei Ia ca și donatorul de celule Tc. Aceste antigene glicoproteice prezente pe suprafața aproape a tuturor celulelor din organism sînt codificate la șoarece de elemente genetice H-2K, D sau L și la om de HLA-A și B. Semnificația operațională a acestui fenomen de restricție este o concentrare a limfocitelor efectoare la nivelul celulelor unde are loc multiplicarea virală, celulele efectoare recrutate neputînd să fie blocate de particulele virale libere din sînge sau alte fluide ale organismului. Virionii izolați sînt atacați mai bine de anticorpii neutralizanți, care sînt produși în exces considerabil, în timp ce numărul celulelor T care sînt implicate în răspunsul imun este în funcție de frecvența precursorilor și de timpul de dublare a efectorilor limfocitari.

Efectul antiviral al celulelor T survine probabil *in vivo* prin distrugerea mediată de celulele Tc a celulelor infectate cu virus în timpul fazei de eclipsă a ciclului infecţios (Zinkernagel, 1977). De fapt, antigenele virale au fost puse în evidenţă la nivelul suprafeţei celulelor cu mult înainte de asamblarea progenului viral (Koszinowski şi colab., 1977; Hupel şi colab., 1978). Astfel, cercetări efectuate *in vitro* au arătat că celulele Tc specifice virusului pot distruge celule-ţintă infectate cu virus vaccinal numai în perioada fazei de eclipsă a ciclului de multiplicare. Necesitatea recunoaşterii antigenelor majore de transplantare aparţinînd clasei I, care sînt ubicuitare, dă posibilitatea limfocitelor Tc imune să funcţioneze în orice ţesut al organismului. Deci, indiferent de localizarea virusului în organism, antigenele majore de transplantare codificate de genele K, D sau L ale complexului H-2 la şoarece (sau A şi B la om) îşi pot îndeplini funcţia de receptori pentru semnale litice pe care le prezintă specific din punct de vedere imunologic. În unele organe, de exemplu creierul, nivelul expresiei produselor de genă ale complexului major de histocompatibilitate este mai mic, dar poate fi crescut prin expunere la interferon imun de tip gamma (Doherty şi Zinkernagel, 1984).

10.6.1. LIMFOCITELE T CITOTOXICE ÎN INFECŢIILE VIRALE EXPERIMENTALE

În infecţiile experimentale cu virusuri care produc o infecţie sistemică la şoareci, s-a constatat că după multiplicarea iniţială a virusului la nivelul organului-ţintă primar, de exemplu piele, urmează diseminarea către organele limfoide şi organele-ţintă secundare, unde are loc o nouă replicare a virusului. După 2—4 zile de la apariţia primelor semne de boală, titrurile virusului încep să scadă în sînge şi organe, moment care coincide cu apariţia imunităţii celulare. Activitatea celulelor T, măsurată *in vitro* prin eliberarea de ^{51}Cr (Cerottini şi Brunner, 1974), determină momentul cînd animalele dobîndesc protecţie celulară sau prezintă o hipersensibilitate de tip întîrziat *in vivo*. Analiza funcţiei celulelor T nu ia în considerare alte mecanisme imune specifice şi nespecifice care pot fi operative în timpul infecţiei, ca anticorpii, citotoxicitatea mediată de celule şi dependentă de anticorp, macrofagele activate, limfokinele, activitatea celulelor NK etc. Limfocitele Tc sînt mai eficiente în controlul diseminării timpurii a virusurilor, în timp ce celelalte mecanisme intervin ulterior şi protejează animalul faţă de reinfecţie. Sînt şi virusuri care nu induc niveluri detectabile de celule Tc la animale (Rollinghoff şi colab., 1977).

Celule Tc specifice virusurilor tumorale pot fi induse *in vivo* la şoarece fie prin inocularea virusului (Herberman şi colab., 1973; Plata şi colab., 1976) sau cu celule tumorale în care genomul viral îşi exprimă unele funcţii (Bubbers, 1978). Cinetica expresiei celulelor T este mai prelungită comparativ cu infecţia acută a şoarecilor şi, de obicei, mult mai slabă. Nivelurile maxime ale activităţii citotoxice sînt atinse în a 10-a şi a 14-a zi de la infecţie. Din cauza activităţii relativ slabe, se foloseşte o metodă suplimentară de evidenţiere — stimularea secundară *in vitro* prin amestec de limfocite — metodă care dă posibilitatea să se selecţioneze celule T citotoxice foarte active faţă de celulele tumorale.

Celulele efectoare implicate în eliminarea tumorilor *in vivo* sau *in vitro* aparțin mai multor clase de limfocite. Cel puțin unele din aceste limfocite efectoare sînt celule T, deoarece sînt sensibile la acțiunea serului anticelulă T plus complement, fapt demonstrat pentru virusul sarcomului Moloney (Herberman și colab., 1973), virusul leucemiei Friend (Blank și colab., 1976), SV40 (Trinchieri, 1976) și virusul tumorii mamare (Stuttman și colab., 1977). Aceste celule T sînt specific virale și cînd sînt evidențiate prin testul eliberării de ^{51}Cr ; citotoxicitatea lor este restrictivă pentru D sau K, cel puțin în sistemele testate.

10.6.2. ANTIGENELE-ȚINTĂ INDUSE DE VIRUSURI

Cît din ciclul de replicare al virusului trebuie să aibă loc într-o celulă pentru ca antigenele induse de virusuri să apară pe celulele-țintă care sînt recunoscute de limfocitele Tc ? Pentru unele virusuri replicarea nu este necesară, de exemplu virusul Sendai, un virus paragripal care are o mare capacitate de a fuziona cu membranele celulare. Virusul Sendai inactivat prin raze ultraviolete nu duce la o infecție productivă, dar poate face celula sensibilă la liză prin inserția hemaglutininei în membrana celulară (Sugamura și colab., 1977, 1978). Deci, pentru unele virusuri determinantul antigenic este prezent pe sau în particula virală și multiplicarea virusului nu este necesară pentru expresia antigenului viral din interiorul celulei (Schröder și colab., 1976). Pentru alte virusuri, de exemplu virusul vaccinal, antigenele virale sînt induse din interiorul celulei și ele apar în faza timpurie de replicare, deci pînă la sinteza ADN viral (Ada și colab., 1976). Folosind antiseruri specifice față de antigenele timpurii sau tîrzii induse de virusul vaccinal pe suprafața celulei, s-a demonstrat că numai antiserurile față de antigenele timpurii pot bloca citotoxicitatea produsă de limfocitele Tc. Deci, virusul infectant poate „marca“ suprafața celulară fie direct cu antigene sau poate să le inducă în faza timpurie a ciclului de multiplicare. În fiecare din cele două împrejurări, celula-gazdă devine susceptibilă la atacul imunologic înainte de asamblarea progenului viral (Zinkernagel și Althage, 1977), deci în timpul fazei de eclipsă a ciclului de multiplicare. Acest fapt a fost dovedit experimental *in vitro* cu virus vaccinal. Progenul de virus vaccinal apare la 3—4 ore după infectarea celulelor L. Dacă aceste celule-țintă sînt expuse celulelor T citotoxice în timpul fazei de eclipsă, liza este mare și cantitatea de progen viral produs este mică. Dacă însă aceste celule-țintă sînt puse în contact cu celule Tc imune la 4 ore după infecție, citoliza este mare, dar cantitatea de progen viral eliberat este egală cu aceea a celulelor infectate martore.

O altă posibilitate de a analiza antigenele-țintă induse de virusuri este folosirea mutantelor termosensibile (*ts*) care fie nu exprimă anumite antigene virale la temperatura nepermisivă sau exprimă o formă mutantă a antigenului normal. S-au folosit mutante *ts* ale virusului stomatitei veziculoase pentru a studia natura antigenelor-țintă virale (Zinkernagel, 1978). VSV codifică pentru trei proteine virale majore : nucleocapsida, proteina matriceală și glicoproteina. Au fost selectate mutante care nu produc sinteză de glicoproteină la temperatura nepermisivă, dar exprimă celelalte două antigene. Celule-țintă infectate cu astfel de mutante și menținute la temperatura nepermisivă nu erau lizate de celule T specifice virusului. Aceste rezultate demonstrează că glicoproteina este antigenul-țintă major pentru celulele T citotoxice specifice VSV.

10.6.3. COMPARAȚIA SPECIFICITĂȚII SEROLOGICE ȘI A CELULELOR T CITOTOXICE

Limfocitele T citotoxice exprimă o specificitate care nu diferă prea mult de cea serologică. Totuși sînt și excepții. Astfel, s-a demonstrat că majoritatea celulelor T imune față de virusul gripal sînt specifice de tip și nu sînt restrictive pentru un subtip particular de hemaglutinină sau neuraminidază (Townsend și Skehel, 1982). Aceleași aspecte de reactivitate încrucișată (după criteriile serologice) s-au găsit și pentru VSV și alphavirus. Experiențele cu tulpini de VSV, diferite serologic, Indiana și New Jersey, au demonstrat că reacțiile încrucișate observate în testele de citotoxicitate mediată de limfocite Tc depindea de tipul H-2 al șoarecelui studiat. De exemplu, celulele T imune față de virusul Indiana și provenite de la șoarecii H-2^b lizau atît celulele infectante cu virusul Indiana, cît și pe acelea infectate cu virusul New Jersey. Reactivitatea încrucișată era mai slabă cu celulele provenite de la șoarecii H-2^d (Rosenthal și colab., 1978).

Din cauza limitării tehnice a testelor de citotoxicitate și a rezultatelor obținute pînă acum, nu se pot face generalizări cu privire la reactivitatea încrucișată observată între subtipuri de virusuri care din punct de vedere serologic sînt diferite antigenic.

10.6.4. EVIDENȚA INTERACȚIUNII DINTRE ANTIGENELE PROPRII (*SELF*) ȘI ANTIGENELE VIRALE

Natura moleculară a receptorului de recunoaștere a limfocitului T este încă nerezolvată. Dezbaterile continuă între cele două posibilități: *1*) celulele T recunosc determinantele virale și antigenele majore de transplantare ca entități distincte sau *2*) receptorul este specific pentru un neoantigen rezultat fie dintr-un complex virus — antigene de transplantare sau unor modificări induse de virus în structurile complexului major de histocompatibilitate. Modelul unui singur receptor de recunoaștere pentru celula T implică interacțiuni între antigenele virale și antigenele proprii. Experiențele cu virusul stomatitei veziculoase (Hecht și Summers, 1976) și virusul vaccinal (Ertl și Koszinowski, 1976) au demonstrat că infecția virală poate influența expresia antigenelor majore de transplantare. Astfel, ambele virusuri scad numărul de antigene H-2 exprimate pe suprafața celulelor, efect produs prin interferența unor proteine „timpurii“ sintetizate de virus care au rolul de a inhiba sinteza proteinelor celulei-gazdă. Unele virusuri, care au înveliș lipoproteic în afara capsidei și care se eliberează din celulă prin „înmugurire“ (*budding*), prezintă în înveliș molecule H-2 (Bubbers și colab., 1978). Un mecanism mai complex prin care virusurile pot influența expresia genei MHC a fost propus de Garrida și colab. (1977). Autorii au constatat că celulele-țintă infectate cu virus vaccinal pierd sau exprimă noi determinante antigenice care pot reacționa cu aloantiseruri. Deci există posibilitatea ca unele virusuri să modifice reglarea expresiei antigenelor MHC și să producă represia sau derepresia unor tipuri similare, dar diferite antigenic, de produse de genă.

O altă evidență a interacțiunii antigenelor virale și antigenelor proprii a fost adus de studiul răspunsului imun celular (celule Tc) față de virusul leucemiei Friend (Bubbers și colab., 1978). Activitatea citotoxică generată *in vivo* era restrictivă preferențial numai pentru K sau D. De exemplu, la șoarecii H-2^b, celulele Tc specifice pentru virusul Friend erau restrictive numai pentru D^b. Virusul izolat din serul șoarecilor infectați conținea produse MHC cu aceeași specificitate, fiind capabile să absoarbă antiserul D al tipului H-2 al gazdei. Pentru virusul izolat de la șoareci H-2^k, absorbția era specifică numai pentru K^k, nu și pentru alți markeri D sau K. Din aceste date experimentale se poate trage concluzia că antigenele proprii K sau D pot forma un complex cu antigenele virale și că răspunsul imun cu celule Tc indus de virus este îndreptat asupra acestui complex. Rezultate asemănătoare au fost obținute și cu alt virus al leucemiei murine — virusul Rauscher.

Reglarea reactivității celulelor T citotoxice specific virale de către genele K și D ale complexului major de histocompatibilitate. Genele care reglează reactivitatea (*responsiveness*) celulelor T citotoxice imune sînt specifice virusului și specifice alelelor H-2 și se găsesc localizate în regiunea K sau D. Deci genele complexului major de histocompatibilitate influențează nu numai specificitatea celulelor T citotoxice, dar și mărimea acestui răspuns.

Toți șoarecii puri din punct de vedere genetic (*inbred*) testați pînă acum prezintă o mare reactivitate (*high responsiveness*) față de virusul vaccinal sau virusul coriomeningitei limfocitare. Totuși, cînd se testează *in vitro* acțiunea limfocitelor imune asupra celulelor-țintă care sînt compatibile numai prin elementele genetice K sau D, răspunsurile variază cantitativ. De exemplu, șoarecii H-2^k generează o activitate citotoxică mare față de virusul vaccinal plus K^k, dar un răspuns slab pentru virusul vaccinal plus D^k.

Reactivitatea mică (*low responsiveness*) a celulelor Tc este specifică virusului, deoarece alela D^k permite un răspuns cu reactivitate mare pentru virusul coriomeningitei limfocitare. Șoarecii H-2^k prezintă o activitate citotoxică redusă pentru virusul coriomeningitei limfocitare, însă puternică pentru virusul vaccinal. Deci, alelele regiunii K determină fenotipul reactiv al celulelor T specifice virale, care sînt restrictive pentru elementul genetic D.

Polimorfismul complexului major de histocompatibilitate (MHC) și susceptibilitatea la boală. Complexul major de histocompatibilitate codifică pentru un număr relativ mic de structuri de suprafață, dar ele diferă de la un individ la altul. Antigenele de transplantare ale șoarecelui sînt complexe și numeroase, peste 50 de specificități serologice diferite. Nu toate aceste specificități sînt prezente la o linie de șoarece, dar orice linie de șoarece moștenește un grup complex sau limitat de antigene. Genele care controlează acești markeri de membrană sînt transmise ereditar și se folosesc simboluri pentru a reprezenta întregul complex de histocompatibilitate. Simbolurile pentru complexul major de histocompatibilitate la șoareci sînt : H-2^{a}, H-2^{b}, H-2^{k}, H-2^{q}.

Trăsătura caracteristică a antigenelor majore de transplantare codificate de MHC care reglează imunitatea mediată de celule T este polimorfismul.

Faptul că MHC are un rol important în reglarea mărimii răspunsului imun și că celulele T exprimă o specificitate de restricție sugerează o relație între polimorfismul MHC, răspunsul imun și supraviețuirea gazdei infectate cu un virus. Celulele Tc protejează gazda față de virus prin distrugerea celulelor infectate acut în timpul fazei de eclipsă a ciclului de multiplicare. Deci protecția imună față de virusuri este mediată, cel puțin parțial, prin distrugerea celulei-gazdă. Evoluția clinică a unei infecții este determinată de capacitatea de distrugere celulară a virusului și de competența de citotoxicitate a celulelor T. Balanța efectelor de care beneficiază gazda față de efectele nocive ale imunității celulare depinde de o serie de factori : citopatogenitatea virusului, rapiditatea cu care diseminează, tropismul de organ sau celulă, antigenicitatea virusului și imunocompetența fenotipului răspunsului imun al gazdei.

Două infecții virale, care reprezintă extreme, ilustrează aceste fapte. Virusul vaccinal la om (virusul ectromeliei la șoarece) prezintă o mare citopatogenitate. Imunitatea mediată de celule este esențială în limitarea infecției, fapt documentat de generalizarea vaccinei la copiii imunizați antivariolic și care sînt deficienți în celule T și de mortalitatea mare la șoarecii infectați cu virusul ectromeliei și deficienți în celule T (Blanden, 1974). Virusul hepatitei de tip B la om și virusul coriomeningitei limfocitare la șoarece produc cealaltă extremă de răspuns față de infecție. Virusurile nu sînt citopatogene și gazdele imunodeficiente nu fac o boală cu evoluție letală. Distrugerea celulară la gazdele imunocompetente și infectate cu aceste virusuri este produsă probabil de răspunsul imun cu celule T al gazdei și nu prin efectele directe ale virusului (Cole și Nathanson, 1975 ; Edington și Chisari, 1975).

Deci, din punctul de vedere al imunității celulare, factorii care permit paraziților intracelulari să producă boala sînt reprezentați de balanța efectelor distructive ale răspunsului imun și abilitatea de a răspunde puternic sau slab față de un antigen, predispoziție care este influențată de genele complexului major de histocompatibilitate.

Așa cum s-a menționat, genele care controlează expresia celulelor T citotoxice sînt specifice virusului și specifice alelelor K sau D, deci se găsesc localizate în aceleași regiuni MHC ca și markerii proprii (*self*-H) restrictivi. Dacă șoarecii ar poseda numai o singură structură MHC de restricție pentru celulele T litice, nu numai individul dar întreaga specie ar fi periclitată de infecția cu virusul ectromeliei. Polimorfismul diminuează șansa de dispariție a speciei prin : *1)* eliminarea posibilității ca virusurile să se poată adapta prin mutație — dobîndind astfel antigene care ar „imita“ markerii proprii ai speciei sau să scape supravegherii imune prin alte metode ; *2)* limitarea reactivității slabe de a răspunde la un antigen numai la cîțiva membri ai speciei și *3)* prin heterozigoție, care, în combinație cu duplicarea anumitor regiuni H-2, acordă fiecărui individ răspunsul imun maxim și protecție.

Importanța genelor MHC în modele experimentale cu virusuri poate fi corelată cu asociația empirică găsită între MHC și susceptibilitatea la boală. Susceptibilitatea sau rezistența față de virus pot fi încadrate în următoarele categorii (Zinkernagel, 1978). Indivizii cu reactivitate mare imunologică au o rezistență relativ crescută față de virusurile cu citopatogenitate mare și o rezistență slabă față de virusurile cu citopatogenitate redusă. La acești indivizi, balanța protecției imune tinde să se încline spre autoagresiune, deoarece distrugerea celulară mediată de celulele T este favorizată de diseminarea virusului. Indivizii cu reactivitate imunologică slabă prezintă o susceptibilitate marcată pentru infecțiile cu virusuri citopatogene acute, și de aceea au fost eliminați prin selecție, dar, probabil, o susceptibilitate mică față de bolile autoagresive induse de virus.

10.6.5. VIRUSURILE INDUCTOARE A HIPERSENSIBILITĂȚII DE TIP ÎNTÎRZIAT — RESTRICȚIA PRIN COMPLEXUL MAJOR DE HISTOCOMPATIBILITATE ȘI FENOTIPURILE DE MEMBRANĂ

Reacțiile imunologice față de antigenele specifice la gazdele imunizate pot fi mediate de anticorpi sau celule. Ultimele reacții au fost clasificate sub termenul general de imunitate mediată de celule. Hipersensibilitatea de tip întîrziat (exemplificată printr-un răspuns inflamator cutanat întîrziat), în care anumite antigene solubile sînt injectate subcutanant sau intradermic la animale sensibilizate, este considerată ca un model *in vivo* de răspuns imun mediat de celule.

Răspunsurile de hipersensibilitate întîrziată față de antigenele specifice reflectă uneori starea de rezistență a organismului față de acest antigen și are valoare clinică în diagnosticul infecțiilor și în testarea imunocompetenței.

Reacția pozitivă de hipersensibilitate întîrziată se însoțește de un proces inflamator caracterizat prin eritem (vasodilatație cu permeabilitate vasculară crescută) și indurație (infiltrație celulară cu limfocite și monocite). Celulele implicate inițial în declanșarea reacției sînt limfocitele T (toate subclasele specifice de limfocite — Td, Tc, Th, Ts). Limfocitele B pot participa prin producerea de limfokine (factor chemotactic monocitar, factorul de inhibare a migrării macrofagelor, factorul de activare a macrofagelor), care au un rol important în patogeneza reacțiilor de hipersensibilitate de tip întîrziat. Limfocitele T se sensibilizează față de un antigen în țesutul periferic sau în ariile dependente de timus a ganglionilor limfatici care drenează locul în care s-a depozitat antigenul. După reexpunere la același antigen, limfocitele T sensibilizate prezintă un proces de transformare, sau blastogeneză, care se însoțește de diviziuni multiple. Limfocitele T care au fost blastogenizate în momentul cînd sînt reexpuse la antigen produc mediatori solubili sau limfokine. Acești mediatori, care sînt eliberați la locul de depozitare a antigenului, inițiază și amplifică răspunsul imun mediat de celule.

Prima semnalare a hipersensibilității de tip întîrziat îi aparține lui Jenner, care descrie evoluția vaccinei la o femeie ce avusese în prealabil *cowpox* (variola bovină). Von Pirquet (1907—1913) observă componentul alergic în vaccinările variolice primare și secundare și în rașul și exantemele produse de virusuri.

„Experimentul natural“ al sindromului de hipogammaglobulinemie la om (Burton, 1952) a atras atenția asupra rolului hipersensibilității de tip întîrziat în rezistența față de infecțiile virale. Copiii cu acest sindrom produc imunoglobuline în cantități foarte mici, dar prezintă reacții de hipersensibilitate aparent normale. Evoluția infecțiilor virale la acești copii este asemănătoare cu aceea a copiilor normali, de asemenea și comportamentul față de vaccinări sau revaccinări cu produse virale.

Experimente cu animale infectate cu virusurile vaccinal sau al fibromei au furnizat evidența rolului hipersensibilității de tip întîrziat atît în însănătoșire, cît și în dezvoltarea leziunilor (Flick și Pincus, 1963).

Hipersensibilitatea de tip întîrziat a fost interpretată ca un răspuns de rejecție a homogrefei față de celulele modificate imunologic prin infecția virală și a fost considerată ca tipul uzual de răspuns imun mediat de celule în infecțiile virale (Allison și Friedman, 1966).

În 1968, Burnet semnalează importanța pe care o are hipersensibilizarea organismului în evoluția rujeolei și a complicației tardive a acestei boli — panencefalita sclerozantă subacută. În această interpretare a patogeniei rujeolei, autorul se bazează pe modificările citologice produse de virusul rujeolic în perioada de incubație, care constau în apariția de celule gigante ce conțin cantități relativ mari de antigen. Organismul se sensibilizează față de antigenele virale, fapt demonstrat de apariția limfocitelor T specifice. În acest fel, în organism sînt două populații de celule : celule care poartă virusul, sau subunități virale, și limfocite T sensibilizate, capabile să reacționeze cu antigenul rujeolic. Prin efectul citotoxic produs de limfocitele T imune, virusul este eliberat din celule, stimulează producerea de anticorpi, iar o parte ajunge în piele și mucoase. Limfocitele sensibilizate sînt de asemenea eliberate în circulație și, ajungînd în piele și mucoase, declanșează exantemul și enantemul caracteristic bolii. Deci rașul rujeolic, ca și rașul din alte viroze este o reacție de hipersensibilitate de tip întîrziat, difuză. O consecință a acestei reacții difuze este și o spoliere temporară a organismului de limfocite T, care explică negativarea reacției Mantoux la convalescenții de rujeolă. La copiii leucemici tratați cu cortizon rujeola evoluează dramatic, sub forma unei pneumonii cu celule gigante, deoarece în lipsa intervenției limfocitelor T imune nu se inițiază faza eruptivă a maladiei. În privința panencefalitei sclerozante subacute, Burnet presupune că, în aceste cazuri, virusul rujeolic ajunge întîmplător în celule găzduite de țesuturi „privilegiate din punct de vedere imunologic“, în sensul că o reacție imună celulară este dificilă sau chiar imposibilă. În aceste condiții, virusul se multiplică lent în sistemul nervos și, cînd atinge un anumit prag, produce leziunile caracteristice panencefalitei sclerozante.

Infecția rujeolică face parte din infecțiile care depresează hipersensibilitatea de tip întîrziat. Recent s-a observat că după administrarea vaccinului rujeolic cu virus viu, reactivitatea la tuberculină se negativează pe o perioadă de minimum 4 săptămîni. Se presupun cel puțin trei mecanisme de depresie a răspunsurilor de hipersensibilitate de tip întîrziat după infecția rujeolică : *1)* infecția rujeolică scade numărul limfocitelor circulante ; *2)* virusul rujeolic infectează cu predilecție limfocitele în faza de proliferare, deci posibilitatea de a interfera cu funcția lor și *3)* virusul rujeolic competiționeaza cu tuberculina pentru situsuri receptoare de la suprafața limfocitelor sensibilizate.

Cercetări recente au arătat că inducerea și expresia hipersensibilității de tip întîrziat de către virusuri depinde de natura virusului, dacă este infectant sau nu, și de calea de pătrundere în organism. Astfel, inocularea subcutanant sau intranazală a șoarecilor cu virus gripal sau Sendai infectant induce două tipuri de răspunsuri : Lyt1 —2— restrictiv pentru regiunea H-2IA care caracterizează fenotipul celulelor Th și Lyt1 —2+ restrictiv pentru regiunile H-2K, D (Ada și colab., 1981). Dacă însă virusul gripal este inactivat prin raze ultraviolete sau se folosește o mutantă de virus Sendai (F—), sînt induse numai celule T cu fenotipul Lyt1+2— restrictive prin regiunea IA. Rezultate similare au fost obținute cu reovirusurile : virusul infectant inoculat subcutanat sau intravenos induce un răspuns de hipersensibilitate restrictiv pentru regiunile H-2D sau H-2K/IA ; reovirusul inactivat și inoculat intravenos induce o stare de toleranță (Weiner și colab., 1980). Rezultate cu totul diferite au fost obținute cu virusul coriomeningitei limfocitare, la care răspunsul de hipersensibilitate de tip întîrziat este restrictiv numai pentru regiunile H-2K, D (Zinkernagel, 1976). Virusul herpes simplex infectant, inoculat subcutanat, induce celule T cu fenotipul Lyt1 +2— restrictive pentru regiunea H-2IA.

Din aceste date experimentale referitoare la tipul de răspuns imun celular indus de virusuri (Th/Td) se trage concluzia că nu se poate face o generalizare de la un virus la altul, datorită faptului că virusul — sau antigenele virale — se asociază cu produse diferite ale complexului major de histocompatibilitate. Virusul gripal, Sendai și reovirusul se asociază cu ambele clase de antigene majore de transplantare (K și D aparținînd clasei I și regiunea I aparținînd clasei a II-a) ; virusul coriomeningitei limfocitare — cu antigene aparținînd clasei I, iar virusul herpes simplex cu antigene aparținînd clasei a II-a. Asocierea cu antigenele MHC este determinată, într-o oarecare măsură, și de calea de pătrundere a virusului. Astfel, calea intravenoasă favorizează un răspuns de hipersensibilitate întîrziată restrictiv pentru clasa I de antigene MHC, în timp ce infecția subcutanată favorizează răspunsuri restrictive pentru antigenele MHC aparținînd clasei a II-a.

Virusurile pot da răspunsuri imune cu celule T supresoare, care inhibă inducerea hipersensibilității de tip întîrziat. Virusul herpes simplex (mutante apatogene sau unele tulpini sălbatice), inoculat intravenos la șoareci, duce la inhibarea inducerii hipersensibilității de tip întîrziat. Se produc însă anticorpi și celule T citotoxice, ceea ce implică o formă deosebită de toleranță (Nash, 1982). Supresia poate fi transferată la recipienți normali prin celule T splenice, începînd cu ziua a 7-a și pînă la cel puțin 200 de zile după inoculare. Deci se pare că răspunsul supresor poate dura toată viața (în modelul studiat). Răspunsul supresor timpuriu este mediat numai de celule Lyt1+2— dar, începînd cu ziua a 28-a postinoculare, apar și celule Lyt1—2+. Este interesant de remarcat că răspunsul cu celule Ts indus de virusul herpes simplex de tip 1 suprimă numai răspunsul de hipersensibilitate întîrziată produs de tipul de virus 1 nu și de tipul 2. Specificitatea de tip a răspunsului cu celule Ts în infecția herpetică se deosebește de celelalte răspunsuri imune (umorale sau celulare), în care există o reactivitate încrucișată între cele două tipuri de virusuri.

Inducerea de celule Ts specifice virale reactive față de hipersensibilitatea de tip întîrziat a fost observată și în alte modele experimentale. De exemplu, reovirusul inactivat cu raze ultraviolete și inoculat intravenos sau administrat pe cale orală duce la inducerea de celule Ts care inhibă răspunsul de hipersensibilitate de tip întîrziat (Rubin și colab., 1981). Virusul gripal activ inoculat intranazal la șoarece induce un răspuns Ts care inhibă răspunsul de hipersensibilitate restrictiv pentru regiunile H-2IA, dar nu inhibă celulele Th să coopereze cu celule B pentru producerea anticorpilor specifici (Liew și colab., 1980). Celulele Ts produse de virusul gripal inactivat inhibă răspunsul de hipersensibilitate restrictiv pentru regiunile DH. O situație similară există și pentru virusul Sendai (mutanta F-). Se poate trage concluzia, din modelele experimentale descrise, că inocularea intravenoasă duce predominant la apariția de celule T supresoare, care sînt active în suprimarea răspunsului de hipersensibilitate întîrziată restrictiv pentru antigenele de histocompatibilitate aparținînd clasei a II-a (Ia). Un astfel de răspuns poate fi în avantajul gazdei, în special prin inhibarea reacțiilor de hipersensibilitate care pot produce leziuni.

Rolul celulelor efectoare ale hipersensibilității de tip întîrziat (Td) și al celulelor T supresoare (Ts) în protejarea organismului față de virusuri și imunopatologia indusă de virusuri. Rolul celulelor T ajutătoare în protecția organismului sau rolul imunopatologic depind de o serie de factori, dintre care cei mai importanți sînt țesutul sau celulele în care are loc multiplicarea virusului, numărul celulelor infectate și extinderea infiltratului inflamator în țesuturile învecinate. Hipersensibilitatea de tip întîrziat are un rol protector față de infecția cu virus herpes simplex care se multiplică în celulele epidermice sau suprafețele mucoase. La șoarecele infectat intradermic în ureche cu virusul herpes simplex are loc o eliminare rapidă a virusului infectant, care se corelează cu apariția hipersensibilității de tip întîrziat; această rezistență specifică poate fi transferată la animale infectate cu celule Lyt1+2— (limfocite Th), dar nu cu celule Lyt1—2+ (limfocite Ts). Mecanismul acestui tip de activitate antivirală nu este cunoscut, dar, probabil, implică activarea macrofagelor prin producerea de limfokine. Observații similare au fost făcute și în infecția produsă de virusul ectromeliei la șoareci, la care este absolut necesar un răspuns cu limfocite T și monocite/macrofage pentru ca focarele hepatice să regreseze (Blanden, 1971).

În alte țesuturi — inimă, plămîni, sistem nervos — răspunsul de hipersensibilitate de tip întîrziat, cu condiția să nu fie excesiv, poate avea același rol protector.

Un exemplu de imunopatie indusă de virus este acela produs de celulele Th/Td în plămînul șoarecilor infectați cu virus gripal (Leung, 1982). Deși acest model experimental nu este tipic pentru evoluția infecției gripale la om, totuși demonstrează cum sensibilizarea cu celule Th/Td față de un virus gripal neinfectant poate duce la imunopatie, dacă animalele sînt inoculate ulterior cu virus activ intranazal.

În acest caz, leziunea este mediată de celule T Lyt1+2— restrictive pentru regiunea IA și de recrutarea activă de monocite/macrofage, deci un răspuns tipic de hipersensibilitate de tip întîrziat. Imunopatia este datorată lipsei unui răspuns adecvat sau reglator, în special lipsei celulelor Ts care au rolul de a limita activarea celulelor Td și, în consecință, infiltrația celulară. Experimental, s-a demonstrat că transferul de celule Ts la șoarecii inoculați cu virusul gripal inactivat previne consolidarea plămînilor și moartea consecutivă inoculării de virus activ intranazal.

Răspunsuri imune „dezechilibrate“ au fost obținute după administrarea unor vaccinuri cu virus viu atenuat (vaccin rujeolic și cu virus respirator sincițial) la persoane care au primit în prealabil vaccinurile corespunzătoare cu virus inactivat.

În concluzie, balanța între răspunsurile Th și Ts poate fi influențată de virusuri pe diferite căi. Natura virusului și în special țesuturile unde au loc multiplicarea virală și asocierea perferențială a virusurilor infectante și neinfectante cu anumite antigene de histocompatibilitate sînt factori importanți care determină dacă răspunsurile de hipersensibilitate întîrziată aduc un beneficiu gazdei sau duc la imunopatie. Din punct de vedere practic, rezultatele sînt favorabile pentru profilaxia cu vaccinuri virale cu virus viu atenuat, care probabil produc un răspuns echilibrat cu celule T și care pot iniția astfel și mecanisme de apărare nespecifice. Vaccinurile virale cu virus inactivat și cele cu subunități virale trebuie cercetate în prealabil din punctul de vedere al răspunsului imun celular care îl declanșează în organism.

10.6.6. CITOTOXICITATEA CELULARĂ DEPENDENTĂ DE ANTICORPI (ADCC) ȘI INFECȚIILE VIRALE

Cercetări *in vitro* au arătat că o varietate de leucocite, incluzînd polinucleare, fagocite mononucleare și unele limfocite (celule K) pot distruge celule-țintă infectate cu virus în prezența anticorpului umoral care are rolul de factor de recunoaștere a țintei.

Deși ADCC antiviral poate fi mediat de leucocitele polinucleare și macrofage, majoritatea lucrărilor indică faptul că celulele K au o funcție importantă în această privință, deoarece sînt dependente de concentrații foarte mici de anticorp și efectul citotoxic pe care îl produc asupra celulelor-țintă este foarte rapid. După vaccinare cu virus vaccinal sau rujeolic, ADCC *in vitro* coincide cu apariția de IgG antivirale *in vivo*. Leucocitele sanguine izolate din sîngele periferic de la copiii vaccinați sau infectați dau citotoxicitate specifică virusului datorită prezenței sau eliberării de anticorpi antivirali în sistemul de testare (Sisson și Oldstone, 1980).

Cu toată evidența indirectă, există în prezent o dovadă minimă în stabilirea rolului ADCC ca sistem de apărare a organismului împotriva virusurilor. Prima evidență *in vivo* care demonstrează că ADCC influențează și modifică infecția virală a fost obținută prin studiul modelului experimental șoareci tineri — infecție herpetică (Kohl și Loo, 1982). Șoarecii tineri au o mare susceptibilitate față de virusul herpetic, evoluția infecției fiind aproape întotdeauna letală. Animalele nu produc anticorpi specifici și leucocitele lor nu mediază citotoxicitatea anticorp-dependentă față de celule-țintă infectate cu virus herpetic. Prin transfer de anticorpi și leucocite de la donatori umani imuni, administrate cu o zi înainte de inocularea virusului, s-a obținut protecție față de o doză letală de virus.

Deoarece atît interferonii, cît și proteinele virale pot amplifica ADCC, reducînd substanțial concentrațiile de anticorpi necesare, acest mecanism celular poate interveni în faza timpurie a unei infecții virale, avînd drept rezultat inhibarea diseminării virale.

10.6.7. CELULE NK ÎN INFECȚIA VIRALĂ

Majoritatea infecțiilor virale — la om și animale — prezintă o evoluție determinată în mare parte de capacitatea gazdei de a limita diseminarea virusului prin răspunsul imun corespunzător. Brațul eferent al răspunsului imun specific poate limita multiplicarea virusului prin mecanisme efectoare variate : neutralizarea infectivității virale prin anticorpi, liza mediată de complement a particulelor virale cu înveliș sau a celulelor infectate și „învelite“ cu anticorpul corespunzător, liza dependentă de anticorp a celulelor infectate prin celulele K sau limfocite T citotoxice specifice.

Generarea de celule Tc necesită activarea celulelor T de către antigenul prezentat de celulele accesorii — macrofage. De obicei, o perioadă de lag de 7—10 zile este necesară pentru ca celulele T să dezvolte maximum de reactivitate primară ; un răspuns de memorie accelerat al celulelor T survine în 2—5 zile după reexpunerea la antigen. ADCC poate fi mediat de diferite leucocite care au receptori pentru porțiunea Fc a moleculei de IgG, fără necesitatea de activare în prealabil. ADCC, totuși, ca și liza mediată de complement, necesită prezența de anticorpi specifici pentru structurile exprimate la suprafața celulelor infectate. Din cauza cerinței de molecule de recunoaștere specifice, ADCC și liza dependentă de „C“ au loc după un interval de timp de la infecția virală egal cu acela al generării de celule Tc specifice. În toate aceste cazuri de infecții virale, cînd memoria imunologică este absentă, și în fazele timpurii ale infecției, cînd răspunsul imun nu este pe deplin exprimat, intervin mecanismele de apărare nespecifice. Mecanismul rezistenței naturale se caracterizează prin abilitatea de a interveni imediat, fără a necesita o preactivare. Deși aceste mecanisme operează într-un mod nespecific, ele sînt reglate *in vivo* să acționeze selectiv față de microorganisme sau celule infectate.

Rezistența naturală este mediată de factori solubili, ca sistemul complement, interferoni și alte citokine, și prin efectori celulari, ca macrofage, leucocite polimorfonucleare și celule NK.

Macrofagele activate, monocitele și leucocitele polimorfonucleare sînt citotoxice sau citostatice față de o varietate de celulă-țintă tumorală sau infectată cu virus. Interacțiunea lor cu celule-țintă nu depinde de recunoașterea antigenică specifică și poate distinge diferite celule-țintă singenice, alogenice și xenogenice.

Printre mecanismele de apărare timpurii, activitatea celulelor NK joacă un rol primar. Celulele infectate cu diferite virusuri sînt lizate eficient printr-un mecanism NK *in vitro* iar funcția NK crescută este paralelă cu cinetica de eliminare a virusului la animalele experimentale infectate acut (Welsh, 1981). Celulele NK, ca și macrofagele și polimorfonuclearele, sînt capabile să lizeze celulele-țintă variate, inclusiv celulele infectate cu virus, neoplazice și celule normale, fără o expunere prealabilă la antigenele specifice *in vivo*.

Cercetări numeroase au demonstrat că celulele NK sînt activate de infecția virală concomitent cu inducerea producerii de interferon. Astfel, leucocitele polinucleare preincubate cu celule infectate cu diferite virusuri (virus gripal, urlian, rujeolic, herpetic), cu celule transformate limfoblastoide sau cu celule tumorale omoară aceste celule-țintă foarte eficient, în 4—12 ore ; în același timp, niveluri mari de activitate antivirală au fost detectate în supernatantul culturilor. Inhibitorul viral produs în aceste culturi a fost identificat a fi interferonul (Blalock și colab., 1979 ; Santolini și colab., 1978 ; Trinchieri și colab., 1978). Majoritatea liniilor celulare umane și liniilor transformate de virusul Epstein-Barr sau de virusul sarcomului Rous sînt capabile să inducă în limfocite interferon. Interferonul uman produs în aceste condiții de cocultivare are caracteristicile interferonului leucocitar de tip alfa, dar o parte din activitate este datorată prezenței interferonului imun.

Efectul de activare asupra celulelor NK produs de interferon poate fi demonstrat și determinat cantitativ prin preincubarea limfocitelor în prezență de interferon și apoi testarea activității citotoxice a acestor limfocite față de celule-țintă care nu produc interferon. Toate cele trei tipuri cunoscute de interferon uman (alfa, beta și gamma) cresc activitatea celulelor NK, deși interferonul gamma este cel mai activ (Perussia și colab., 1980 ; Lucero și colab., 1981). În afară de interferon, celulele inductoare de interferon, virusurile, acizii ribonucleici dublu-catenari sintetici (poli I:C) cresc activitatea celulelor NK prin producerea de interferon (Trinchieri și colab., 1978).

Deși celulele NK prezintă o citotoxicitate crescută după tratament cu interferon, ele nu prezintă un aspect diferit de specificitate comparativ cu celulele neactivate ; o caracteristică importantă este însă faptul că omoară eficient celulele-țintă care nu sînt foarte sensibile față de citotoxicitatea celulelor NK netratate. Creșterea în capacitatea de citotoxicitate ca rezultat al stimulării prin interferon este proporțional mai mare față de aceste celule-țintă mai puțin sensibile, decît față de celulele-țintă foarte sensibile. Celulele tratate cu interferon sînt capabile să lizeze celule tumorale autoloage sau alogenice, care sînt relativ rezistente la liza față de celulele NK nestimulate. Efectul combinat între activarea nespecifică prin interferon și stimularea specifică a limfocitelor Tc și NK prin antigenele asociate tumorilor reprezintă un aspect important al apărării organismului față de celulele neoplazice (Vanky și colab., 1980).

Interferonul produs de limfocitele induse de virusuri și celulele infectate cu virus pot activa *in vivo* celulele NK, care distrug celulele-țintă infectate cu virus într-un stadiu incipient al infecției.

Interferonul stimulează activitatea celulelor NK prin cel puțin trei căi : *1)* prin creșterea numărului de celule NK capabile să se lege de celulele-țintă și prin proporția de celule citotoxice din populația totală NK — recrutarea de celule pre-NK (Silva și colab., 1980 ; Timonen și colab., 1982) ; *2)* prin accelerarea cineticii lizei și *3)* prin creșterea reciclării celulelor NK active.

Creșterea activității NK a fost observată în condiții în care interferonul extracelular nu poate fi pus în evidență. Dacă fibroblaste umane — care nu induc interferon — sînt folosite ca celule-țintă, s-a demonstrat recent că aceste celule infectate cu virus sau glicoproteine virale purificate cresc activitatea celulelor NK printr-un mecanism independent de eliberarea de interferon în lichidul extracelular (Casali și colab., 1981). Această activitate independentă de interferon se exercită mai devreme decît activitatea indusă de interferon și este complet inhibată prin fragmentele $F(ab)_2$ ale anticorpilor specifici glicoproteinelor virale (Casali și Oldstone, 1982). Deci, un mecanism de activare a celulelor NK independent de interferon poate juca un rol în creșterea susceptibilității celulelor infectate cu virus față de liza NK.

Activitatea NK crescută a fost demonstrată la bolnavii tratați cu interferon leucocitar, la 12—24 de ore după prima administrare (3×10^6 unități IFN) (Einhorn și colab., 1978). Totuși, la 143 de bolnavi cu neoplazii diferite, tratați cu interferon alfa produs prin tehnologia ADN recombinant, nu s-a observat o creștere a activității NK, ci, dimpotrivă, o depresie la 30% din bolnavi (Maluish și colab., 1983).

Date mai recente au arătat că interferonul și inductorii de interferon produc apariția pe suprafața celulelor NK de receptori pentru factorul de creștere a celulelor T — Interleukina 2 (IL-2) (Kuribayashi și colab., 1981). Datele sugerează posibilitatea ca interferonul să acționeze *in vivo* nu numai direct, prin creșterea activității celulelor NK, dar și prin inducerea proliferării acestor celule. Capacitatea interferonului de a induce transformarea blastică, sinteza de ADN și proliferarea celulelor NK a fost demonstrată *in vivo* la șoareci, în cursul unor infecții virale experimentale (Biron și colab., 1983). Deoarece interferonul *in vitro* induce expresia receptorilor IL-2, este posibil ca efectul *in vivo* al interferonului asupra proliferării celulelor NK să fie mediat de IL-2. De altfel, IL-2 singur poate crește indirect activitatea celulelor NK, deci este posibil ca efectele interferonului și IL-2 să fie sinergice.

Astfel, în cazul infecției virale, interferonul produs *in vivo* poate induce sistemul NK la diferite niveluri, incluzînd diferențierea precursorilor NK, proliferarea celulelor mature NK și creșterea activității citotoxice. Efectul pretratării cu interferon a celulelor-țintă este paradoxal antagonist aceluia obținut prin pretratarea celulelor efectoare. Celulele-țintă devin rezistente față de efectul citotoxic al celulelor NK și gradul de protecție depinde de doza de interferon folosită și de sensibilitatea celulelor-țintă față de interferon (Einhorn și colab., 1979 ; Trinchieri și colab., 1981). Fibroblastele normale sînt complet protejate, chiar de doze mici de interferon, în timp ce celulele infectate cu virus și majoritatea liniilor tumorale nu sînt protejate, chiar de doze mari de interferon. Toate trei tipurile de interferon uman protejează fibroblastele umane de liza mediată de celulele NK. Tratamentul cu interferon al celulei-țintă nu scade susceptibilitatea lor față de celulele K, celulele citotoxice sau față de liza prin complement și anticorpi. Deoarece celulele NK se leagă de celulele-țintă tratate cu interferon, efectul protector al interferonului împiedică, probabil, o etapă specifică în secvența litică inițiată în celulele-țintă. O creștere a nivelului de acid sialic la suprafața celulei a fost propusă ca bază moleculară pentru protecția mediată de interferon (Yogeśwaran și colab., 1982).

Pe baza rezultatelor experimentale *in vitro*, confirmate în parte și *in vivo*, se poate afirma că interferonul are un rol reglator în activitatea celulelor NK *in vivo*.

Celulele NK sînt prezente la toți indivizii normali în absența oricărei sensibilizări. Activitatea citotoxică a acestor celule, care poate fi menținută prin niveluri foarte mici de interferon, este paradoxal îndreptată împotriva oricărui tip de celulă, inclusiv celulele țesutului normal. Totuși, un efect litic al celulelor NK asupra țesuturilor normale nu a fost observat, din următoarele cauze : *a)* activitatea mică a celulelor NK în condiții fiziologice de repaus ; *b)* susceptibilitatea relativ mică a celulelor normale față de citotoxicitatea mediată de celulele NK și *c)* inactivarea continuă a celulelor NK după interacțiunea cu celulele tisulare. Cînd un stimul inductor de interferon apare într-un țesut (infecție virală sau creștere tumorală), se produc niveluri mari de interferon care induc o secvență de evenimente. Celulele NK devin foarte active și sînt capabile să lizeze orice tip de celulă. Interferonul protejează celulele țesutului normal și împiedică inactivarea celulelor NK care s-ar produce prin legarea lor de celulele-țintă. Acest efect crește indirect citotoxicitatea celulelor NK. Cum efectul protector al interferonului este selectiv, celulele infectate cu virus sau celulele tumorale nu sînt protejate. Astfel, activitatea celulelor NK va fi concentrată asupra celulelor patologice. Deci interferonul dă posibilitatea sistemului NK să dobîndească două caractere necesare pentru orice mecanism de apărare eficient : inductibilitatea și selectivitatea. Infecția virală previne inducerea rezistenței în celula-țintă, probabil prin efectul de inhibare asupra sintezei de proteine ale gazdei. La majoritatea virusurilor, acest efect este foarte timpuriu în ciclul de multiplicare, și deci există posibilitatea ca celulele infectate cu virus să fie lizate cu mult înainte de asamblarea particulei virale (Biron și Welsh, 1982).

Date experimentale au demonstrat că IL-2 induce producerea de interferon gamma printr-un mecanism care implică cooperare între macrofage și celule asemănătoare celulelor NK (Pearlstein, 1983). Relația între interferon și IL-2 este destul de complexă, pentru că interferonul poate induce receptor pe celulele NK pentru IL-2 și IL-2 induce creșterea și maturarea celulelor NK.

Rolul celulelor NK in vivo. Celulele NK au un rol important *in vivo* în rezistența față de anumite tumori și diseminarea lor metastatică, cît și față de infecțiile virale. În afară de aceste activități nespecifice, celulele NK mediază și alte funcții *in vivo*, hematopoieza și funcții imune, fie direct, fie prin producerea de limfokine.

Activitatea crescută a celulelor NK a fost observată în cursul cîtorva infecții virale — cu virus citomegalic, virus gripal, virus sincițial respirator (Auselo și colab., 1983 ; Ennis și colab., 1981 ; Quinnan și colab., 1981). O creștere în activitatea NK a fost observată la bolnavii cu transplant renal și cercetări recente sugerează o corelație între infecția fatală cu virus citomegalic și activitatea scăzută a celulelor NK la bolnavii cu transplant de măduvă osoasă și supuși unui tratament imunosupresiv.

O corelare între susceptibilitatea la infecție cu virusul herpes simplex de tip 1 și activitatea NK scăzută față de celule-țintă infectate cu același virus a fost observată la nou-născuții prematuri și la bolnavii cu sindrom de imunodeficiență dobîndită (Lopez și colab., 1982). Rolul celulelor NK în limitarea infecției virale a fost demonstrat și în modele experimentale la șoareci. Infecția cu unele virusuri induce interferon și crește activitatea celulelor NK (Welsh, 1981). În timpul infecțiilor cronice cu virusul coriomeningitei limfocitare, activitatea NK rămîne crescută pentru cîteva luni (Bukowski și colab., 1983). Șoarecii cu activitate NK supresată au rezistență scăzută față de infecția cu virusul hepatitei șoarecilor, virusul citomegalic murin și virusul vaccinal.

Rolul sistemului interferon — celule NK și rezistența față de infecțiile persistente cu virus este sugerat de unele observații făcute la bolnavii cu boli în a căror etiologie sînt implicate virusuri persistente (Bloom și colab., 1980). O diminuare semnificativă în capacitiatea limfocitelor periferice de a produce interferon după inducere cu virus rujeolic sau cu virusul maladiei Newcastle a fost constatată la bolnavii cu scleroză multiplă, lupus sistemic eritematos și diabet juvenil. Deficiența în activitatea celulelor NK la acești bolnavi poate fi atribuită unui număr de cauze, în special deficiența în producerea de interferon sau deficiența celulelor precursoare de a răspunde la interferon și a deveni celule NK funcționale. Cercetările au demonstrat că toate aceste trei posibilități pot apărea în maladiile sus-menționate.

Deși rolul celulelor NK *in vivo*, în infecțiile virale, așteaptă o definire mai clară, se pot totuși întrevedea implicațiile acestei rezistențe neinduse și rolul ei complementar sau chiar primar în apărarea gazdei.

10.7. ASPECTE IMUNOLOGICE ÎN TUMORILE INDUSE DE VIRUSURI

Teza centrală în imunologia tumorală se bazează pe afirmarea că celulele tumorale au neoantigene, numite TAA *(Tumor Associated Antigens)*, care nu sînt prezente în celulele normale. Experiențe realizate începînd cu anul 1920 au constituit suportul experimental pentru această afirmație, în sensul că s-a constatat că tumorile care apar la un animal sînt respinse atunci cînd sînt implantate la alt animal și că rejecția este accelerată dacă animalul — recipient" a fost imunizat în prealabil cu țesut tumoral. Experiențele au fost făcute pe animale diferite din punct de vedere genetic și cu mult înainte de cunoașterea antigenelor complexului major de histocompatibilitate care sînt prezente la suprafața celulelor normale. Respingerea celulelor tumorale transplantate de la un animal adult la un animal de aceeași specie, dar neînrudit genetic, nu este un fenomen specific celulelor tumorale, deoarece celulele normale transplantate între animale adulte, dar diferite din punct de vedere genetic, sînt respinse.

De abia după anul 1930, cînd s-au obținut linii de șoareci pure din punct de vedere genetic *(inbred)*, au fost posibile studiile de caracterizare a antigenelor de suprafață ale celulelor normale. Antigenele de transplantare sau antigenele de histocompatibilitate au fost definite prin sistemul H-2 la șoarece și sistemul HLA la om. Antigenele de histocompatibilitate sînt moștenite prin mecanisme clasice autozomale și sînt responsabile pentru rejecția grefei la animalele nesingenice. Deoarece sînt posibile numeroase combinații ale antigenelor de histocompatibilitate, la animalele nesingenice șansa ca doi indivizi să fie identici este extrem de mică. Tulpini de șoareci, pure din punct de vedere genetic, necesare analizei răspunsurilor imune față de TAA, au fost obținute prin mai multe generații de încrucișări frate — soră (Little, 1941 ; Strong, 1942). La aceste tulpini de șoareci, toate genele sînt prezente în stare homozigotă și fiecare genă de histocompatibilitate este prezentă în două copii identice.

Celulele tumorale rețin multe din antigenele de suprafață prezente în celulele progenitoare normale. Cînd tumorile sînt transplantate între animale cu antigene de histocompatibilitate diferite, este imposibil să se facă deosebirea între respingerea datorită prezenței antigenelor specific tumorale de respingerea datorită diferențelor în antigene de histocompatibilitate.

Cercetări inițiale efectuate pe șoareci au demonstrat că, dacă un țesut sarcomatos indus cu 3-metilcolantren este grefat la un animal singenic și apoi îndepărtat chirurgical, animalul devine imun față de a doua grefă. Respingerea era specific tumorală, deoarece șoarecii imunizați rejectau grefa de tumoră, dar acceptau grefele de piele normală. de la donatorul tumorii. Rezultatele acestor tipuri de experiențe au dus la concluzia că tumorile induse la animale, chimic sau prin inoculare de virusuri, conțin TAA (Gross, 1943 ; Foley, 1953 ; Klein și colab., 1960 ; Sjögren, 1965).

Trei tipuri majore de neoantigene au fost găsite în tumorile induse experimental de virusuri sau substanțe chimice : *1)* antigene specifice tumorale unice, caracteristice tumorilor induse de substanțe chimice. Acestea sînt antigene „puternice“ și sînt specifice pentru fiecare tumoră individuală. Tumorile individuale exprimă un neoantigen unic care nu este exprimat de alte tumori induse de același carcinogen în același organ al unui animal individual ; *2)* antigene comune găsite la tumorile induse de virus și care reacționează încrucișat cu alte tumori induse de același virus ; *3)* antigene oncofetale produse în celulele tumorale de gene normale care sînt depresate ca rezultat al transformării maligne. Aceste antigene sînt prezente în celulele fetale normale sau în celulele puțin diferențiate ale gazdei adulte.

Protecția pe care răspunsurile imune o conferă gazdei față de antigenele tumorale este dependentă de capacitatea acestor antigene de a servi ca țintă pentru răspunsul imun. Această abilitate este determinată în parte de localizarea celulară a antigenului. Maximum de protecție este conferit de antigenele tumorale prezente în mebrana celulară, care pot deveni ținte pentru atacul imunologic. Antigenele tumorale sechestrate în interiorul citoplasmei sau nucleului pot da un răspuns imun numai după liza celulei tumorale. Mai dăunătoare sînt antigenele tumorale care sînt „slab" asociate cu suprafața celulară, care pot fi ușor eliberate de celulă, ducînd astfel la apariția de anticorpi care blochează efectul altor mecanisme imune ale gazdei.

Tumori induse de virusuri. Virusuri ADN și ARN pot schimba caracteristicile de creștere a celulelor *in vivo* — la animale — sau *in vitro* — în culturi celulare. Tumorile animalelor induse de virusuri prezintă un interes deosebit atît pentru determinarea mecanismului de transformare, cît și pentru investigarea rolului răspunsurilor imune ale gazdei în creșterea tumorală.

Celulele tumorale pot fi induse *in vitro* prin infectarea celulelor normale cu virus și demonstrarea transformării prin modificările morfologice, biochimice și caracteristicile de creștere anormală. Tumorile pot fi induse *in vivo* prin inocularea virusurilor fie local, fie sistemic. Virusurile tumorale ADN nu sînt, în general, oncogene la gazdele naturale la care se replică și lizează celulele infectate. Sînt oncogene pentru celulele speciei pe care le transformă, dar nu se replică și nu lizează celula infectată. Sînt trei grupuri de virusuri ADN oncogene la animal : virusurile Papova (virusul papilomului, virusul polyomei șoarecilor și virusul vacuolant — SV40 — la maimuțe), adenovirusurile și virusurile herpetice.

Neoantigene asociate cu virusurile oncogene ADN. Cel puțin patru tipuri de neoantigene au fost detectate pe celulele infectate cu SV40 ; aceste antigene sînt caracteristice pentru majoritatea celulelor infectate cu virusuri oncogene ADN și vor fi enumerate în continuare : *1)* antigenul T *(tumor)* este localizat în nucleu și a fost demonstrat inițial prin teste de fixare a complementului cu seruri de la hamsteri purtători de tumori induse de SV40 (Pope și Rowe, 1964 ; Rapp și colab., 1964). Localizarea nucleară a antigenului T a fost demonstrată prin teste de imunofluorescență. Antigenul T are o greutate moleculară de 70 000 daltoni, este codificat de virus și are rol în sinteza ADN viral. Din cauza localizării intranucleare, antigenul T nu este considerat semnificativ în respingerea tumorilor ; *2)* antigenul U este localizat tot în nucleu, poate fi evidențiat prin tehnici de imunofluorescență (Lewis și Rowe, 1971). Antigenul U este prezent în extractele de tumori de la hamsteri induse cu SV40 și în celulele infectate sau transformate de acest virus ; *3)* antigenele de transplantare specific tumorale au fost identificate prin capacitatea lor de a induce reacția de respingere față de celulele tumorale transplantate. Antigenele sînt codificate de celulă și nu de virus, sînt specifice virusului și nu au specificitate de specie (Hary și Defendi, 1970). Deoarece imunitatea celulară față de aceste antigene mediază respingerea tumorii, sînt considerate cele mai importante dintre antigenele tumorale induse în celulă de infecția virală ; *4)* antigenele S sînt definite ca antigene de suprafață ale celulei tumorale și fără importanță în rejecția tumorii. Uneori, celulele tumorale induse de SV40 pot să exprime și antigene fetale.

Neoantigene asociate cu virusuri ARN. Oncornavirusurile (virusurile oncogene ARN) induc tumori la gazdele lor naturale şi pot, simultan, să transforme celulele şi să se multiplice în ele. Multe din ele sînt virusuri endogene şi se transmit prin genomul gazdei. Expresia virusului poate fi indusă chimic sau tumorile apar spontan. Un reprezentant major al acestei familii de virusuri sînt virusurile de tip C, foarte răspîndite la aproape toate speciile de vertebrate. Celulele tumorale infectate cu virusuri de tip C exprimă antigene determinate atît de virus, cît şi de genomul gazdei şi pot fi clasificate în antigene structurale care fac parte din învelişul viral, antigene intravirale şi antigene la suprafaţa celulară induse de virus.

Patru antigene majore au fost demonstrate în învelişul viral ; aceste glicoproteine sînt asociate cu antigenul gp70 (glicoproteină cu greutate moleculară 70 000) care este specific de subgrup (dă reacţii încrucişate între toate virusurile murine de tip C şi induce anticorpi protectori faţă de inocularea cu celule leucemice) (Duesberg şi colab., 1970). După infecţie, anticorpii limitează diseminarea virusului ; animalele cu titruri mari de anticorpi neutralizanţi au titruri mici de virus infectant în sînge şi în splină. Antigenele intravirale se găsesc sub învelişul viral şi sînt cunoscute sub denumirea de p30, p15 şi p12 (adică proteine cu greutatea moleculară de 30 000, 15 000 şi 20 000 daltoni) şi sînt de asemenea antigenice (Baldwin şi Price, 1976). Antigenele de suprafaţă induse de virus au fost demonstrate prin respingerea tumorilor transplantate. Ele au fost puse în evidenţă prin tehnici de imunofluorescenţă sau prin teste de citotoxicitate dependente de complement. Între antigenele de suprafaţă se include şi antigenul GCSA *(Gross Cell Surface Antigen)* găsit la nivelul membranelor celulelor infectate cu virus Gross. Acest antigen este foarte răspîndit şi poate fi evidenţiat pe celulele leucemice şi pe celulele tumorale din plasmocitoame. Un alt antigen de suprafaţă este antigenul de membrană oncogenic felin, care a fost găsit la toate celulele care poartă virusul de tip C al leucemiei felinelor.

Antigene virale în tumori umane. Virusurile asociate cu tumorile umane includ : virusul Epstein-Barr, care produce mononucleoza infecţioasă şi care a fost asociat cu limfomul Burkitt şi carcinomul nazofaringian ; virusul herpes simplex de tip 2 a fost asociat carcinomului cervical iar virusurile de tip C au fost asociate leucemiilor. Antigene virale au fost găsite în toate celulele acestor tumori şi au fost folosite drept argument al rolului cauzativ al virusului. Evidenţa cea mai puternică — dar nu concluzivă — este implicarea EBV ca agent etiologic al limfomului Burkitt, virusul fiind un prim candidat pentru rolul virusurilor oncogene la om. Antigenele EBV au fost folosite în studii seroepidemiologice şi pentru investigarea eficienţei unui vaccin faţă de acest virus.

Studiile seroepidemiologice sînt adeseori folosite ca primă etapă în implicarea virusurilor în anumite maladii şi pentru asocierea lor cu anumite neoplazii. Deoarece majoritatea virusurilor umane sînt ubicuitare, imunitatea faţă de aceste antigene este larg răspîndită şi datele trebuie evaluate pe baza probabilităţilor statistice mai mult decît pe simpla prezenţă sau absenţă a imunităţii. Pentru astfel de studii, rolul protector al antigenului nu este important ; prezenţa imunităţii celulare şi umorale față de antigenele virale a fost în majoritatea cazurilor folosită numai ca evidență a faptului că gazda a fost expusă la antigen.

Antigene asociate EBV au fost puse în evidență în celulele tumorale ale limfomului Burkitt și în celulele tumorale epiteliale ale carcinomului nazofaringian. Aceste antigene sînt absente în alte celule ale bolnavilor. Antigenele prezente în celulele infectate sînt foarte asemănătoare cu cele evidențiate în celulele animalelor infectate cu virusuri ADN. Antigenul nuclear este prezent în toate celulele infectate examinate, dar localizarea lui intracelulară respinge posibilitatea că acesta ar fi antigenul care mediază liza celulelor tumorale printr-un mecanism imunologic. Alte două antigene au fost găsite în celula infectată : antigenul timpuriu și antigenul capsidal viral. Aceste două antigene pot fi evidențiate numai în celulele care au intrat ireversibil în ciclul litic. Anticorpii față de antigenele capsidale au fost folosiți în studiile seroepidemiologice. Două antigene de membrană sînt asociate cu infecția EBV. Primul a fost numit antigen de membrană și a fost identificat prin teste de imunofluorescență folosind seruri de la indivizii seropozitivi și este prezent în celulele din biopsiile de limfom Burkitt și în unele linii celulare limfoblastoide derivate din ele. Un al doilea antigen, denumit antigenul de membrană limfocitar, pare să fie antigenul de transplantare specific tumoral. Acest antigen a fost evidențiat *in vitro* printr-un test de citotoxicitate specific care folosește limfocitele T de la bolnavii cu mononucleoză infecțioasă și liniile celulare limfoide care poartă genomul viral.

Virusul herpes simplex de tip 2 și carcinomul cervical. Virusul herpes simplex de tip 2 a fost asociat cu carcinomul cervical pe baza studiilor de hibridizare făcute pe material provenit de la biopsie și care au pus în evidență un fragment din ADN viral în țesutul neoplazic (Frenkel și colab., 1972). Cercetări ulterioare au confirmat prezența unui ARN specific viral în celulele obținute din displazii și carcinoame cervicale (Eglin și colab., 1981).

Asocierea virus-tumoră s-a făcut și pe baza evidențierii unor markeri proteici virali în tumorile cervicale. Un antigen viral denumit Ag-4 a fost evidențiat în 90% din biopsiile de tumori cervicale comparativ cu 10% la martori (Aurelian și colab., 1973). 91% din bolnavele cu carcinom au titruri mari de anticorpi față de antigenul Ag-4, comparativ cu 5—9% la martori (Aurelian și colab., 1975). O incidență crescută de anticorpi la bolnavele cu carcinom de col s-a găsit și față de o proteină virală nestructurală timpurie (VP134) (Melnick și colab., 1976).

Mai recent s-a semnalat prezența la aceste bolnave a anticorpilor față de două proteine virale, una din ele (proteina cu greutate moleculară de 38 000 daltoni) fiind codificată de un fragment al ADN viral, capabil de transformare *in vitro* (Gilman și colab., 1980).

Ca și în multe asociații virus — tumoră, proba absolută că virusul herpes simplex de tip 2 este o cauză a carcinomului cervical va fi obținută numai după evaluarea statistică a eficacității administrării unui vaccin viral sau a unei terapii antivirale.

Răspunsuri imune față de antigenele asociate tumorilor. La animale, răspunsurile imune față de antigenele tumorale sînt foarte complexe și includ generarea sau activarea celulelor efectoare și formarea de anticorpi.

Celulele-gazdei implicate în rejecția tumorală includ limfocite T, macrofage, celule nefagocitare care poartă receptori Fc, eozinofile, monocite. Majoritatea cercetărilor experimentale care implică aceste celule în respingerea tumorală au fost obținute cu tumori induse. Tipuri diferite de celule efectoare își asumă rolul dominant în funcție de tumoră. Macrofagele îndeplinesc un rol important în respingerea tumorii, efectele lor fiind mediate de macrofage activate nespecific sau specific prin intermediul limfocitelor T sensibilizate. Răspunsurile în anticorpi duc la neutralizarea virusurilor oncogene și la citotoxicitatea dependentă de complement și mediată de anticorpi, care poate avea un rol important în imunitatea față de virusurile leucemice. Rolul anticorpilor fixatori de complement în respingerea tumorilor solide este mai puțin evident, în sensul că pînă acum nu există dovezi de implicare a lor în acest fenomen imun. Celulele efectoare implicate în omorîrea celulelor tumorale învelite cu anticorpi includ limfocite B, celule care poartă receptori Fc, macrofage și celule K.

În momentul de față, modificări majore au loc în imunologia tumorală. Imunologia tumorală s-a bazat pe trei concepte : *a)* prezența de antigene specifice tumorale sau antigene asociate tumorilor ; imunitatea mediată de celule T față de aceste antigene, în special celule T citotoxice, a fost considerată ca jucînd un rol central în creșterea tumorală ; *b)* teoria supravegherii imune față de tumori în care imunitatea mediată de celulele T era considerată de importanță capitală și *c)* posibilitatea ca imunoterapia să reprezinte o metodă eficace în vindecarea neoplaziilor.

Eforturi considerabile au fost făcute pentru a urmări eficacitatea imunoterapiei prin inducerea sau creșterea imunității mediate de celulele T sau prin eliminarea factorilor care interferează cu acest braț al imunității. Majoritatea lor s-au soldat cu eșecuri, neputîndu-se demonstra efecte clare pentru parametrii imunologici monitorizați, chiar în acele testări în care imunoterapia a avut efecte clinice.

Au apărut contradicții în legătură cu previziunile majore asupra ipotezei supravegherii imune. Astfel, deși toate tumorile induse experimental la animal au antigene asociate tumorilor, nu este încă evident că toate tumorile spontane de la animale sau tumorile umane au astfel de antigene. S-a constatat, de asemenea, absența unei reactivități a celulelor T citotoxice față de multe tumori umane și că unele rezultate pozitive obținute erau datorită citotoxicității nespecifice.

Lipsa unei creșteri majore a incidenței tumorale la șoarecii nuzi atimici sau la șoarecii timectomizați neonatal a pus la îndoială importanța majoră a celulelor T în monitorizarea și respingerea continuă a celulelor neoplazice.

Descoperirea celulelor NK și a altor celule efectoare naturale a deschis noi perspective asupra canceptului de supraveghere imună și asupra rolului distinctiv pentru sistemul imun în rezistența față de creșterea tumorilor, chiar la indivizii deficienți în celule T și față de tumorile neimunogene (Herberman, 1980).

10.8. IMUNOPROFILAXIA ŞI INFECŢIILE VIRALE

Imunoprofilaxia, fie prin imunizare activă cu vaccinuri virale sau protecţie pasivă cu imunoglobuline, reprezintă singura modalitate de control efectiv al infecţiilor virale prin aplicarea lor la indivizii susceptibili. Vaccinurile virale pot fi : vaccinuri cu virus viu atenuat care produc o infecţie fără boală aparentă clinic, vaccinuri cu virus inactivat care trebuie administrate în doze antigenice suficiente pentru a obţine un răspuns imun satisfăcător şi vaccinuri cu subunităţi virale, obţinute prin tehnicile moderne de biologie moleculară şi biotehnologie.

Imunoprofilaxia cu vaccinuri cu virus viu atenuat. Cu mult înainte de a se cunoaşte agenţii etiologici ai bolilor infecţioase, s-a observat că după episodul acut al unei boli ca variola sau rujeola, organismul dobîndeşte o stare de protecţie care durează toată viaţa. Aplicarea cu succes, dar plină de hazard, a unor cantităţi mici de lichid din pustulele de variolă pe pielea persoanelor neinfectate — procedeu denumit variolizare —, în momentul cînd nu se ştia nimic despre natura agentului infectant şi cînd nici răspunsul imun nu era înţeles, a fost un efort de a imita fenomenul natural.

Introducerea de către Jenner a vaccinării cu *cowpox* (1796) — virusul variolei vacilor — a fost prima folosire documentată a unui vaccin viral cu virus viu atenuat şi începutul imunizării moderne.

Acest principiu de imunizare profilactică, prin folosirea de tulpini atenuate ale aceluiaşi virus sau tulpini strîns înrudite antigenic cu virusul faţă de care se urmăreşte protecţia organismului, constituie o metodă larg răspîndită şi eficientă în controlul maladiilor virale umane sau animale. Exemple în medicina umană sînt vaccinurile faţă de febra galbenă (1937), poliomielită (1956), rujeolă (1960), gripă (1943). În medicina veterinară exemple de vaccinuri cu virus viu atenuate sînt vaccinurile faţă de febra aftoasă, turbare, maladia Newcastle, variola ovină etc.

Imunizarea activă cu virus viu este în general preferabilă imunizării cu vaccinuri cu virusuri inactivate, deoarece dă un răspuns imun superior şi de lungă durată, asemănător răspunsului imun obţinut după boala naturală. O singură doză de vaccin cu virus viu atenuat este suficientă pentru imunizare ; imunizări multiple sînt necesare în vaccinarea antipoliomielitică în caz de infecţie concomitentă cu alte enterovirusuri sau de interferenţă între cele trei tipuri de virusuri administrate simultan.

Condiţiile care asigură eficienţa unei vaccinări cu virus viu atenuat sînt următoarele : *1*) însănătoşirea din boala naturală trebuie să fie urmată de imunitate la reinfecţie, cel puţin faţă de aceeaşi tulpină antigenică de virus, iar varietatea tulpinilor circulante de virus, diferite din punct de vedere antigenic, să fie limitată. *2*) Virusul folosit pentru prepararea vaccinului trebuie să fie similar din punct de vedere antigenic (nu este necesar întotdeauna să fie identic) cu virusul care produce boala. *3*) Virusul din vaccin să fie suficient de atenuat pentru a nu produce boală aparentă clinic, dar să se multiplice pentru a asigura masa antigenică necesară declanşării răspunsului imun. *4*) Modificarea virusului pe care se bazează folosirea lui în vaccin trebuie să fie stabilită din punct de vedere genetic, pentru a evita riscul dobîndirii caracterului virulent, care poate surveni cînd virusul din vaccin este excretat și trece la contacți nevaccinați. 5) Vaccinul trebuie să fie obținut pe un substrat lipsit de virusuri adventițiale, ca de exemplu SV40 și virusurile leucozei aviare.

Injectarea parenterală a unui vaccin cu virus viu atenuat sau inactivat produce anticorpi circulanți, dar nu este urmată de apariția de imunoglobuline specifice de tip IgA la nivelul mucoaselor tracturilor respirator și intestinal.

Vaccinurile cu virus viu au un avantaj asupra vaccinurilor cu virus inactivat (care trebuie injectate) dacă pot fi administrate pe calea naturală a infecției și dacă producerea locală de IgA este un factor important în prevenirea stabilirii infecției. Această diferență a fost demonstrată de cele două tipuri de vaccinuri poliomielitice.

Vaccinurile cu virusuri vii atenuate nu trebuie administrate la femei gravide, din cauza efectului potențial asupra fătului. Vaccinurile cu virusuri vii pot produce boli severe la gazdele incompetente din punct de vedere imunologic. Deci, nu pot fi administrate la bolnavii sub tratament cu corticosteroizi, droguri alkilante sau alți agenți imunosupresori.

Imunizarea profilactică cu vaccinuri cu virusuri inactivate. Se obișnuiește în practică să se considere vaccinurile cu virusuri inactivate ca vaccinuri cu virus „omorît“. Termenul „omorît“ este incorect, pentru că ceea ce se înțelege prin virus inactivat este faptul că nu este infectant, dar este posibil să se extragă acid nucleic viral infectant din astfel de virusuri și pot fi reactivate prin diferite procedee (Fenner, 1962).

Pentru a obține un astfel de vaccin, două condiții sînt absolut necesare : *1*) virusul trebuie să se multiplice suficient de bine pe un anumit substrat, deoarece masa antigenică virală este asigurată numai de cantitatea de antigene virale prezente în vaccin și *2*) metodele folosite pentru inactivare și prin care se urmărește anihilarea potențialului de multiplicare viral nu trebuie să modifice antigenele virale care sînt importante în producerea anticorpilor protectori.

Vaccinurile cu virusuri inactivate prezintă o serie de dezavantaje : *1*) trebuie administrate în mai multe doze ; *2*) se injectează și deci nu pot fi aplicate la poarta de pătrundere a virusului în organism ; *3*) din cauza cantității de substanță administrată nu trebuie să conțină cantități mari de antigene nevirale, ca de exemplu antigene din ou sau substanțe de natură nervoasă care pot declanșa reacții alergice. În general, imunitatea produsă de aceste vaccinuri are o durată mai scurtă comparativ cu cea obținută după infecția naturală sau vaccinarea cu vaccinurile cu virusuri vii atenuate.

Vaccinurile cu virusuri inactivate „ideale“ nu trebuie să conțină tot virionul, ci numai antigenele de înveliș, purificate de proteinele din mediu. Încercări în acest sens s-au făcut cu vaccinuri gripale preparate cu hemaglutinină virală obținută prin tratarea virusului cu detergent sau eter (Davenport și colab., 1964 ; Webster și Laver, 1966) și cu vaccinuri care conțin antigenele solubile ale adenovirusului (Kasel, 1966).

Încercări de a elabora noi vaccinuri. O aplicație practică importantă în elaborarea de noi vaccinuri se atribuie astăzi metodelor de biologie moleculară și biotehnologiei dezvoltate în ultimii 10 ani. Tehnicile specifice disponibile astăzi pentru caracterizarea genomului viral (electroforeza în gel de poliacrilamidă, cartografierea nucleotidelor, hibridizarea moleculară a acizilor nucleici) au făcut posibilă cunoașterea secvențelor nucleotidice a ARN sau ADN viral și deci posibilitatea de a deduce secvențele de aminoacizi care caracterizează diversele antigene virale. Tehnologia fuziunii celulare a dus la prepararea de anticorpi monoclonali față de anumite antigene virale și, în consecință, oferă posibilitatea unei analize asupra componenților antigenici individuali care contribuie la răspunsul imun protector al gazdei sau la imunopatologie.

Aplicarea tehnologiei ADN recombinant în elaborarea de vaccinuri are drept scop producerea de vaccinuri cu subunități virale și obținerea de sușe defective sau atenuate utilizabile ca vaccinuri virale vii. ADN viral sau o copie ADN a virusurilor ARN, inserat în plasmida bacteriană și clonat într-o celulă bacteriană care joacă rol de gazdă, induce produse de genă virală iar analiza secvenței nucleotidelor permite identificarea genelor care codifică diverse antigene.

Producerea de antigene prin această metodă permite două avantaje : securitate mai ales pentru vaccinurile contra virusurilor virulente, pentru că se folosesc gene izolate, și puritate, vaccinurile fiind lipsite de alte proteine care pot avea efecte adverse.

Astfel de vaccinuri cu subunități virale, obținute prin tehnologia ADN recombinat, se prevăd în gripă și hepatite de tip B. S-au obținut rezultate privind expresia clonării genelor hemaglutininei virusurilor gripale atît în celulele procariote (Davis și colab., 1981), cît și eucariote (Getling și Sambrook, 1981). Producerea de hemaglutinine în celule simiene s-a dovedit superioară celei obținute în sistemul procariot *E. coli*, deoarece produsul este glicozilat și foarte apropiat de hemaglutinina obținută din învelișul viral.

Pentru hepatita de tip B, în absența unui sistem de cultură pentru propagarea virusului, vaccinul se prepară cu particulele de 22 nm AgHBs purificate din serul uman. Se cunoaște însă gena care codifică pentru acest antigen viral de suprafață și această genă inserată într-un vector corespunzător poate fi exprimată în diverse sisteme-gazdă (*E. coli*, drojdie de bere, linii celulare de mamifere) (Tiollais și colab., 1981). S-a demonstrat că AgHBs obținut prin tehnica ADN recombinant conține determinantele de grup și subtip ale virusului și, injectat la șoarece, induce anticorpi cu mare afinitate pentru AgHBs uman.

Peptide sintetice ca antigene virale. Peptidele sintetice care „mimează“ structura anumitor virusuri au dat rezultate încurajatoare în cadrul virusului hepatitei de tip B, virusului rabic și virusului febrei aftoase. Pentru acest din urmă virus peptide cu greutate moleculară mică, reprezentînd secvențele de aminoacizi ai proteinei capsidale majore a virusului, stimulează eficiența sintezei de anticorpi neutralizanți. Aceste antigene sintetice, în general, fiind peptide mici, pot să nu stimuleze satisfăcător răspunsul imun, în cazul în care se comportă ca haptene. O corecție poate fi făcută prin atașarea lor la molecule mari care sînt efective în inducerea sistemului macrofag — celulă T.

Deși în ultima decadă s-au acumulat cunoștințe valoroase privind componenții răspunsului imun, o înțelegere deplină a mecanismului pentru intoducerea artificială a imunității depinde de analiza interreacțiilor între acești componenți și de funcția fiecăruia. Se știe că parametrii răspunsului imun diferă de la un tip de microorganism la altul și deci se impune o analiză detaliată a răspunsurilor imune față de agenți individuali pentru a furniza o bază științifică pentru imunoprofilaxie și imunoterapie.

Imunizarea pasivă: gammaglobuline imune pentru profilaxie și tratament. În unele viroze este posibil să se confere o protecție de scurtă durată prin administrarea de ser imun sau gammaglobulină obținută din ser. Serurile heteroloage provoacă un răspuns imun față de componenții noi antigenici, de aceea se preferă gammaglobulina umană.

Anticorpii, fie sub formă de ser total sau fracționat, imunoglobuline concentrate dintre care predominant este tipul IgG, pot fi obținuți de la donatori care s-au însănătoșit după o infecție virală sau au fost imunizați. Acești anticorpi dau o protecție imediată și imunizarea pasivă este utilă indivizilor care nu pot produce anticorpi sau gazdei normale care poate face maladia înainte ca imunizarea activă să stimuleze producerea de anticorpi.

Importanța imunizării pasive este diminuată în virozele în care s-au obținut vaccinuri (de exemplu, rujeola), dar gammaglobulina umană este singurul tratament profilactic pentru prevenirea hepatitei infecțioase și poate fi folosită pentru acele persoane supuse unui risc mare de infecție. În acest caz, indivizii protejați parțial pot face o infecție subclinică după care se imunizează activ.

Folosirea gammaglobulinei umane pentru prevenirea defectelor congenitale datorită virusului rubeolic este o problemă controversată. Scopul profilaxiei în acest caz este de a preveni infecția fătului prin influențarea viremiei femeii gravide. Din rezultatele obținute pînă acum s-a constatat că gammaglobulina normală administrată femeii gravide la scurt timp după contactul infecțios nu previne întotdeauna anomaliile congenitale, dar încă nu sînt date suficiente cu privire la reducerea virusului sau asupra eficienței administrării de gammaglobulină specifică obținută de la convalescenții de rubeolă.

Imunizarea pasivă este o metodă profilactică importantă în alte infecții virale umane. În turbare, de exemplu, imunizarea combinată — activă și pasivă — a persoanelor mușcate de animale turbate dă o protecție mai bună decît imunizarea activă numai cu vaccin. În rujeolă, maladie în care timpul de expunere poate fi determinat destul de precis, gammaglobulina imună împiedică declanșarea bolii, dacă este administrată în doze mari în primele 5—6 zile după expunere, sau modifică evoluția și severitatea bolii dacă se administrează o doză mai mică în același interval de timp.

Injecții regulate de imunoglobulină umană sînt folosite în terapia de substituție la copiii cu hipogammaglobulinemie.

Gammaglobuline folosite în profilaxia virozelor sînt redate în tabelul 10-I.

TABELUL 10-I

Boala	Produsul	Cantitatea	Observaţii
1	2	3	4
Hepatită A	Globulină serică imună umană	0,02 mL/kg i.m., imediat după expunere, cu un efect protector; durează aproximativ 2 luni	Modifică dar nu previne infecţia. Recomandată pentru contacţii din locuinţa bolnavului. În alte colectivităţi nu se face decît dacă o epidemie este în progres. Recomandată pentru cei ce pleacă în regiuni endemice
Hepatită B	Globulină imună anti-hepatită B de origine umană	0,06 mL/kg i.m., imediat după expunere, preferabil într-un interval de 7 zile; o a 2-a injecţie la 25—30 de zile după expunere	Nu se administrează la persoane care au anticorpi anti-AgHBs. Administrarea oricărui vaccin cu virus viu trebuie amînată cîteva luni după ce s-a dat această gammaglobulină concentrată. Unii experţi recomandă administrarea unei singure doze de 0,13 mL/kg la nou-născuţii care provin din mame care au făcut hepatită B în al treilea trimestru de sarcină şi care sînt seropozitive în momentul naşterii
Rujeolă	Gammaglobulină imună umană	0,25 mL/kg i.m., imediat după expunere; la persoanele imunocompetente doza poate fi ineficace; în acest caz se administrează 20—30 mL	Vaccinul rujeolic cu virus viu poate preveni infecţia naturală dacă este administrat într-un interval de 48 h după expunere. Dacă se dă imunologobulină, imunizarea cu virus viu nu se poate face 3 luni de la administrarea anticorpului. Nu se mai vaccinează copiii sub 15 luni
Oreion	Imunoglobulină umană antiurliană	1,5 mL i.m. pentru copii; 4,5 mL peste 12 ani	Eficacitatea este îndoielnică. Este posibilă folosirea la băieţii neimunizaţi pentru a preveni orhita, care apare la o proporţie de 20% din bolnavi, dar produce rar sterilitate. Doze mai mari pot fi eficace dacă profilaxia este întîrziată
Turbare	Imunoglobulină umană antirabică (serul antirabic cu origine ecvină este mai puţin recomandabil)	20 UI/kg din care 50% este infiltrat local la nivelul plăgii şi restul i.m.	Se administrează imediat după expunere. Se recomandă după muşcături sau zgîrieturi făcute de carnivore, chiar dacă animalul este aparent sănătos şi dacă creierul nu poate fi examinat imediat pentru diagnostic. Nu se recomandă la indivizii care au anticorpi, datorită unei profilaxii prealabile

TABELUL 10-I (continuare)

1	2	3	4
Vaccină	Globulină imună vaccinală de origine umană	Profilactic: 0,3 mL/kg Terapeutic: 0,6 mL/kg i.m.	Se administrează în locuri diferite dacă este folosită pentru prevenirea diseminării, la un bolnav cu o boală cutanată și care trebuie vaccinat. Poate preveni sau modifica variola, dacă este dată într-un interval de 24 h după expunere. Poate fi folosită în tratamentul leziunilor oculare produse de virus vaccinal, vaccină eczemotoasă, vaccină generalizată și necrozantă
Varicelă	Gammaglobulină imună antivaricelă-zoster sau globulină imună anti-zoster	3–5 mL i.m., într-un interval de 72 h de la expunere	Se recomandă la copiii sub 15 ani neimunizați, cu leucemii, limfoame sau imunocompetenți, după contact cu un caz cunoscut de varicelă-zoster și la nou-născuții proveniți din mame care au avut varicelă, 4 zile înainte de naștere sau 48 h după. Modifică boala naturală și nu previne dezvoltarea imunității Dacă gammaglobulina specifică nu este disponibilă, se poate administra globulină serică normală, 0,6–1,2 mL/kg i.m.

Potențialul anticorpilor monoclonali pentru optimizarea controlului virozelor. Majoritatea antigenelor cînd sînt injectate într-un organism imunocompetent induc un număr mare de tipuri clonale de limfocite B distincte, fiecare producînd un tip unic de imunoglobulină. În consecință, serul-anti va conține populații diferite de anticorpi și, în funcție de concentrațiile lor, vor avea anumite funcții efectoare și specificitate antigenică. Această policlonalitate a serurilor-anti a fost o problemă majoră în imunologia virală, în sensul că a fost greu și uneori imposibil să se obțină seruri specifice pentru proteine virale individuale, deoarece procedeele de purificare nu duceau la obținerea de preparate cu grad mare de puritate și uneori produceau modificări ale proprietăților imunogene și antigenice ale proteinelor. Încercările inițiale de a depăși aceste dificultăți prin cultivarea *in vitro* a clonelor de celule B care secretă anticorpi cu o anumită specificitate au dat rezultate nesatisfăcătoare, datorită faptului că precursorii celulelor B produc un număr relativ mic de progeni care secretă anticorpi, au o viață foarte scurtă *in vitro* și produc cantități mici de anticorpi antivirali monoclonali (Gerhard și colab., 1975). Situația s-a schimbat cînd Köhler și Milstein (1975) au reușit să transforme celulele B murine, induse cu hematii de oaie, în linii celulare care cresc și secretă continuu anticorpi, prin hibridizare cu celule de mielom murin. Ulterior, transformarea celulelor B, indusă cu virus în linii celulare care secretă anticorpi, a devenit metoda de elecție pentru producerea de anticorpi antivirali deoarece furnizează cantități practic nelimitate de anticorpi omogeni care pot fi caracterizaţi din punct de vedere al proprietăţilor fizice, funcţiei şi specificităţii.

Anticorpii monoclonali au fost folosiţi pentru caracterizarea detaliată a proteinelor virale care sînt structurile-ţintă pentru anticorpii neutralizanţi. În acest sens, observaţii interesante au fost făcute cu virusul gripal şi ulterior şi cu alte virusuri. Astfel, cînd s-au testat anticorpi monoclonali faţă de hemaglutinina virusului gripal, şi anume eficienţa lor de neutralizare, s-a constatat că o mică fracţiune de virus rămîne non-neutralizată. Analiza virusului rezistent neutralizării a demonstrat că această fracţiune este reprezentată de variante ale virusului parental şi la care epitopul recunoscut de anticorpul folosit în testul de neutralizare era modificat (Gerhard şi colab., 1984). Rezultate asemănătoare au fost obţinute cu toate virusurile studiate pînă acum prin testul de neutralizare cu anticorpi monoclonali. Datorită omogenităţii lor, anticorpii monoclonali pot evidenţia modificări minore la nivelul antigenului-ţintă şi pot deosebi virusuri care diferă unul de altul printr-un singur aminoacid.

Folosirea anticorpilor monoclonali în testări funcţionale antivirale *in vitro* (ca de exemplu, inhibarea adsorbţiei virusului la nivelul celulei-gazdă, neutralizarea virală, modularea sau liza celulelor-ţintă etc.) şi *in vivo* au demonstrat că anticorpii faţă de aceeaşi proteină virală au activităţi antivirale diferite. Aceşti anticorpi cu funcţii diferite pot acţiona competitiv şi, în combinaţie, pot reduce activitatea antivirală dorită (Yewdell şi Gerhard, 1982) sau pot acţiona aditiv sau chiar sinergic. Aceste studii vor fi utile în înţelegerea interacţiunilor complexe care survin *in vivo* între virusuri şi mecanismele de apărare ale gazdei dependente de anotimp şi vor sta la baza producerii unor amestecuri active optime de anticorpi monoclonali care, într-un viitor apropiat, vor fi folosiţi în imunoprofilaxie sau imunoterapie.

Anticorpii monoclonali pot furniza date importante asupra relaţiilor existente între proprietăţile antigenice, biologice şi epidemiologia virusurilor. Supravegherea epidemiologică cu ajutorul anticorpilor monoclonali a diferitelor tulpini de virus rabic a scos în evidenţă deosebiri antigenice ale virusurilor izolate în diverse regiuni geografice (Wiktor şi colab., 1980). Aceste diferenţe antigenice pot explica unele eşecuri ale tratamentului antirabic şi indică necesitatea folosirii unor tulpini în prepararea vaccinului care să fie antigenic identice cu tulpinile circulante în aria geografică respectivă.

Anticorpii monoclonali au fost folosiţi experimental *in vivo* pentru a acorda rezistenţă animalului faţă de unele virusuri (Belachandran şi colab., 1982 ; Dix şi colab., 1981). Deşi aceşti anticorpi pot conferi protecţie faţă de unele viroze (encefalite cu alphavirus, herpes simplex, virus gripal), este posibil ca folosirea lor în scopul terapeutic să nu fie indicată, deoarece dă oportunitatea selecţiei de mutante de virusuri şi duce la un *„drift“* antigenic depărtat de tulpina de virus sălbatic predominantă faţă de care majoritatea populaţiei a dobîndit imunitate. Se impune însă folosirea de amestecuri de anticorpi monoclonali care să acţioneze necompetitiv la niveluri diferite ale infecţiei virale şi prin mecanisme efectoare diferite. Folosind această metodă, este posibil să se micşoreze dozele efective terapeutice şi profilactice de anticorpi şi astfel să se minimalizeze reacțiile adverse rezultate din sensibilizarea față de determinante imunoglobulinice străine.

Pînă în prezent, majoritatea anticorpilor monoclonali au fost obținuți prin imunizarea unui animal, cel mai frecvent, șoarecele.

Recent, s-au obținut anticorpi monoclonali hibrizi cu regiunea constantă de origine umană și partea variabilă obținută prin injectarea antigenului la animal (Boulionne și Hizumi, 1985).

Prin folosirea tehnologiei ADN recombinant asociată cu aceea a hibridoamelor, s-au obținut gene artificiale, care codifică pentru cele două domenii ale anticorpului și care au fost introduse într-o linie celulară care, în mod normal, nu produce anticorpi. O parte din celule acceptă această grefă genetică și produce anticorpi „himerici", cu regiunea constantă de origine umană și cea variabilă de origine animală.

10.9. ASPECTE IMUNOPATOLOGICE ASOCIATE INFECȚIILOR VIRALE

Răspunsul imun față de virusuri poate steriliza organismul și eradica infecția, dar în același timp poate produce modificări patologice și chiar efecte letale la gazdă.

Virusurile pot infecta celulele sistemului imun și deci transforma capacitatea gazdei de a genera răspunsuri imune. Prin acest mecanism, virusurile produc efecte biologice secundare, prin depresia sau stimularea răspunsului imun față de alte antigene nevirale. Depresia imunității umorale și celulare poate face gazda mai sensibilă față de alți agenți infectanți sau mai puțin activă în supravegherea celulelor transformate. Capacitatea unor virusuri de a crește imunitatea umorală sau celulară poate fi un factor important în etiologia bolilor autoimune.

10.9.1. RĂSPUNSURI FAȚĂ DE ANTIGENE NEVIRALE

Șoarecii infectați acut sau persistent cu unele virusuri ADN sau ARN pot da răspunsuri modificate față de alte antigene, fapt demonstrat prin urmărirea următorilor parametri ai funcției imune: nivelul de Ig, inducerea toleranței imunologice, respingerea grefelor, reacția grefei față de gazdă, reacția de hipersensibilitate de tip întîrziat și transformare limfocitară (Oldstone, 1979). De exemplu, șoarecii infectați persistent cu virusul coriomeningitei limfocitare dau răspunsuri imune slabe față de Ig de mamifere sau aviare, comparativ cu martorii neinfectați. Scăderea răspunsului imun nu era datorită diferenței în activitatea anticorpului sau prezentării antigenului de către macrofage, ea fiind indusă direct de o scădere a numărului celulelor formatoare de anticorpi. În continuare, în tabelul 10-II vom prezenta unele mecanisme ale imunopatologiei induse de virus.

TABELUL 10-11

Mecanisme ale imunopatologiei induse de virus

Mecanisme	Patologie
1. Infecția sistemului imun	Modificarea funcțiilor imune
2. Formarea de complexe virus-anticorpi circulante	Maladia complexelor imune
3. Interacțiunea anticorpului antiviral și complementului cu antigenele induse de virus care sînt localizate la suprafața celulară	Distrugerea celulei infectate
4. Interacțiunea celulelor imune (limfocite și macrofage) cu antigenele induse de virus de la suprafața celulară	Distrugerea celulei infectate
5. Răspunsuri imune față de antigenele celulei-gazdă care au fost eliberate, modificate sau depresate de virus	Reacții autoimune
6. Eliberarea și/sau activarea de meditatori biologici din: *a*) limfocite sensibilizate; *b*) complement; *c*) kinine, factori de coagulare etc.	Inflamații, reacții alergice și distrugerea celulelor infectate și neinfectate

Alte virusuri pot scădea sau crește răspunsurile imune față de unele antigene. Von Pirquet (1908) a observat că reacția pozitivă la tuberculină devine negativă în timpul infecției cu virus rujeolic, fapt confirmat ulterior și de alți cercetători (Finkel și Dent, 1973). Răspunsurile slabe față de multe antigene nevirale survin la rozătoarele infectate cu virusurile leucemiei. Virusul dehidrogenazei lactice crește capacitatea șoarecilor de a produce anticorpi față de imunoglobulinele umane.

Deși relativ puține virusuri au fost studiate suficient din punctul de vedere al generării răspunsurilor imune față de numeroase antigene nevirale, fenomenul prezintă un interes deosebit, deoarece explică mecanismul prin care virusurile pot produce efecte biologice secundare importante.

Conceptul de specificitate este o temă atît de dominantă în imunologie, încît tinde să treacă cu vederea faptul că imunizarea cu anumite antigene nu duce numai la formarea anticorpilor specifici, dar și la activarea nespecifică a celulelor B. O caracteristică a majorității infecțiilor virale este creșterea anticorpilor atît specific, cît și nespecifici.

10.9.2. INTERACȚIUNEA VIRUSULUI CU SISTEMUL IMUN

Virusurile induc formarea de complexe imune și boală. Particulele virale, după interacțiunea cu sistemul imun al gazdei, produc un răspuns specific de anticorpi. Anticorpii se combină cu virusul sau antigenele virale în fluidele organismului sau la nivelul membranei plasmatice a celulelor infectate și formează complexe antigen-anticorp (Oldstone, 1975). Odată formate, aceste complexe pot fi „prinse“ de anumite țesuturi. Țesuturile mai cunoscute care au această proprietate sînt acelea cu o vascularizație bogată și cu capilarele căptușite cu celule endoteliale fenestrate (glomeruli, renali, plexuri coroide, splină, noduli limfatici etc.). La indivizii infectați cu oricare din virusurile ADN sau ARN, formarea complexelor antigen — anticorp reprezintă un mecanism important al gazdei pentru eliminarea virusului. Totuși, cînd acest *clearance* al virusului nu are loc și cînd producerea depășește eliminarea, complexele se acumulează la nivelul țesuturilor producînd leziuni și boală, prin acțiunea mediatorilor inflamației. Virusurile pot induce complexe imune și prin alte două mecanisme : *1)* virusul poate acționa ca un mitogen și stimula activarea policlonală a limfocitelor B sau poate crește activitatea nespecifică a limfocitelor Th, care activează limfocitele B în prealabil sensibilizate față de antigenele nevirale sau antigenele virale înrudite. Anticorpii astfel induși se pot lega ulterior de antigenele corespunzătoare și pot forma complexe imune. *2)* Al doilea mecanism se numește mimetism molecular *(molecular mimicry)*. În acest caz, antigenele virale au secvențe de aminoacizi comune cu antigenele gazdei, astfel încît anticorpii antivirus se pot lega atît de antigenele virale, cît și de antigenele proprii ale gazdei (Fujinama și colab., 1983).

Aceste două mecanisme explică formarea de autoanticorpi (față de actină, miozină, filamente intermediare și nuclei etc.) care apar în majoritatea infecțiilor virale ca și a anticorpilor față de virusuri neînrudite (de exemplu, apariția de anticorpi antirujeolici la bolnavii cu hepatită de tip B, cu titruri mari, ca și în panencefalita sclerozantă subacută — infecția cronică produsă cu acest virus).

Multe aspecte ale boli, produse prin complexe imune sînt definite de observațiile clinice făcute de Clemens von Pirquet, în 1900. Baza experimentală a acestei impresii clinice a fost realizată ulterior printr-o serie de experiențe cantitative pe iepuri, la care boala serului — acută sau cronică — a fost indusă cu proteine heteroloage iar prezența complexelor antigen — anticorp a fost evidențiată fie în circulație, fie la nivelul injuriei tisulare (Dixon și colab., 1963). Deoarece nu toate animalele cărora li s-a injectat proteină heteroloagă (albumină bovină) făceau boală, s-a sugerat importanța controlului genetic asupra cantității și tipului de anticorp în maladia cu complexe imune.

Alți factori care influențează evoluția complexelor imune sînt sistemul reticuloendotelial implicat în eliminarea acestor complexe (Wilson și Dixon, 1971) și sistemul complement (Agnello și colab., 1972). Astfel, s-a constatat că bolnavii cu deficiențe în sistemul complement prezintă mai frecvent o localizare tisulară a complexelor imune. În acest context, este important de semnalat că unele virusuri pot modifica nivelurile de complement și componenții sistemului complement.

Sînt multe exemple de infecții virale persistente asociate cu răspunsuri imune continue ale gazdei și formarea de complexe imune circulante. Această interacțiune virus — anticorp (IgG — C) nu neutralizează virusul, deci procesul infecțios se poate extinde și la alte celule care prezintă receptori fie pentru Fc, fie pentru C3 (macrofage, leucocite polinucleare, limfocite B).

Prima observație asupra prezenței complexelor virus—anticorp infectante a fost făcută în cursul studiului infecției persistente cu virusul dehidrogenazei lactice la șoareci (Notkins și colab., 1966). Complexe de acest tip au mai fost semnalate și în alte infecții virale persistente, ca de exemplu infecția șoarecelui cu virusul coriomeningitei limfocitare (Oldstone și Dixon, 1969), boala nurcii aleutine (Porter și Larsen, 1967), anemia infecțioasă a cailor (McGuire și colab., 1972), infecții cu retrovirusuri.

Indiferent de virusul sau proteinele virale care induc formarea complexelor imune, aspectul morfologic este caracteristic pentru toate cazurile de depunere de complexe imune. Microscopia cu imunofluorescență a țesutului glomerular suspectat a fi suferit injuria imunologică prezintă o acumulare de Ig, compuși variați ai complementului și antigene virale, în depozite localizate în pereții capilarelor. Anticorpul antiviral specific din complexele depozitate este identificat și determinat cantitativ prin eluarea imunoglobulinei legate de țesut, care este apoi recuperată prin adsorbție cu diferite antigene virale și tisulare. Anticorpul legat de țesuturi se găsește în cantitate de cel puțin 10 ori, și obișnuit de 50 de ori mai mare comparativ cu cel din circulație.

10.9.3. GENE ALE GAZDEI ȘI GENE VIRALE CARE DETERMINĂ GRADUL FORMĂRII COMPLEXELOR IMUNE ȘI DEPOZITAREA LOR

Evenimentele (infecția virală, imunizarea) care duc la formarea complexelor virus — anticorp sînt relativ clare, dar factorii care modulează gradul formării și depozitării lor în țesuturi sînt abia acum înțeleși. Majoritatea informației a rezultat din studiul infecției cu virusul coriomeningitei limfocitare la șoareci, care a fost folosit ca model-prototip. Deși șoarecii infectați persistent cu virusul coriomeningitei produc răspunsuri continue față de cele trei polipeptide structurale ale virionului (Oldstone și colab., 1980), cantitățile de anticorpi variază între tulpini (Oldstone și colab., 1983). De exemplu, titrul anticorpilor la șoarecii infectați persistent și aparținînd tulpinii SWR/j este de 50 de ori mai mare decît la șoarecii BALB. Răspunsurile mari de anticorpi corelează direct cu niveluri mari de complexe imune și complement circulante și cu depozitarea lor în glomeruli și plexurile coroide. O serie de gene sînt implicate în formarea complexului virus — anticorp și în primul rînd genele localizate în regiunea I (Ir) a complexului H-2 la șoarece și HLA-D la om.

Formarea complexelor imune este determinată și de diferențele genomice între variantele aceluiași tip de virus. Deși virusul coriomeningitei limfocitare era cunoscut că prezintă un singur tip de virus, cercetări recente — amprente nucleotidice și anticorpi monoclonali — au demonstrat variante de virus cu diferențe de genom și biologice (Dutko și Oldstone, 1983). Astfel, cantitățile de complexe imune prezente la șoarecii SWR/j infectați persistent cu tulpina Armstrong 1371 erau mai mari comparativ cu cantitățile găsite la aceeași tulpină de șoareci, dar infectați cu virusul coriomeningitei Pasteur.

Injuriile produse de virus prin inducerea complexelor imune pot explica unele simptome ale infecției acute. De exemplu, modificările psihice și iritabilitatea unor bolnavi poate fi corelată cu modificări ale electroliților și apei (permeabilitate crescută) în sistemul nervos central, inițiate de depozitarea complexelor în plexurile coroide. Vasculita produsă de complexele imune poate duce la artrită, mialgie și raș ; glomerulonefrita prin complexe imune poate duce la o injurie glomerulară acută.

Deoarece infecțiile virale persistente sînt frecvent asociate cu manifestări ale formării și depunerii de complexe imune, un sindrom de lungă durată cu complexe imune și a cărui etiologie este necunoscută poate sugera o cauză virală. De exemplu, complexele imune au fost puse în evidență la mulți — dar nu la toți — bolnavii cu neoplazii diferite, în dezordinile demielinizante, ca scleroza multiplă, și în maladii degenerative, ca scleroza laterală amiotrofică. Totuși, pînă cînd identitatea antigenului sau a anticorpului din complexul imun nu va fi cunoscută, nu se poate susține etiologia virală în aceste maladii.

10.10. ROLUL VIRUSURILOR ÎN AUTOIMUNITATE

Ca fenomen care aparține imunobiologiei, autoimunitatea oferă posibilitatea de studiu al reglării normale a răspunsului imun prin examinarea perturbării funcției esențiale și majore a sistemului imun, și anume discriminarea între ceea ce este propriu organismului *(self)*, de ceea ce este străin *(non self)*. Autoimunitatea este un fenomen biologic major în medicina clinică, deoarece multe maladii umane cu etiologie nedeterminată încă au un component autoimun. În unele boli, componentul autoimun implică un număr mai mare de organe și antigene tisulare, ca de exemplu în lupusul sistemic eritematos, boală în care apar autoanticorpi care reacționează cu ADN, ARN, proteine citoplasmatice, limfocite și eritrocite. De asemenea, la bolnavi cu poliendocrinopatii apar autoanticorpi care reacționează cu pancreasul, tiroida, pituitara și mucoasa gastrică. În alte maladii, ca de exemplu *myasthenia gravis*, componentul imun este restrictiv și îndreptat predominant față de receptorul acetilcolină.

Modele de autoimunitate experimentale pe animale, ca și anumite exemple din medicina clinică lasă puțină îndoială asupra faptului că virusurile joacă un rol important în patogeneza autoimunității.

Multe date care se referă la rolul factorilor genetici, imunologici și virusologici în patogenia maladiei autoimune provin din studiul modelelor pe animale, în special șoarecii NZB *(New Zeeland Black)* și NZW *(New Zeeland White)*. Șoarecii NZB/NZW F1 — prima generație obținută după încrucișarea celor două tulpini — dezvoltă spontan celule lupice caracteristice, anticorpi antinucleari, anticorpi anti-acizi nucleici, anticorpi față de antigenele virusului leucemiei murine și anemie hemolitică autoimună (Mellors, 1966). În plus, o infiltrație cu celule plasmatice și limfocitare în multe organe — plămîni, ficat, rinichi și glande salivare. Maladia acestor animale este foarte asemănătoare lupusului eritematos sistemic ; ca și în maladia umană, glomerulonefrita este dată de depunerea de complexe imune și complemente, anticorpii fiind specifici ADN celular și unui antigen caracteristic virusului leucemiei murine. Șoarecii NZB și NZB/NZW în vîrstă fac limfoame și monoglobulinemie monoclonală — deci simptome asemănătoare maladiei umane cunoscută sub denumirea de macroglobulinemia Waldenström. Asocierea de dezordini autoimune și limfocitare maligne la această tulpină de șoareci este considerată a fi produsă de eliberarea celulelor B de sub controlul celulelor T, avînd drept rezultat inițial boala autoimună și, mai tîrziu, malignitatea celulelor B. Lupusul eritematos sistemic canin este o boală autoimună, în a cărei etiologie sînt implicate particule virale de tip C caracteristice virusurilor leucemice (Lewis și Schwartz, 1971).

Boala aleutină a vizonului *(Aleution Disease of Mink)* este o viroză a vizonului de crescătorie homozigot pentru o genă recesivă de culoare — gena aleutină. Maladia se caracterizează prin glomerulonefrită, leziuni vasculare asemănătoare poliarteritei nodoase, hipergammaglobulinemie și proliferare marcată cu celule plasmatice (Porter și Lassen, 1974). Prezența de anticorpi a mai fost semnalată în infecții experimentale cu reovirusuri, virusul vaccinal și Sendai (Onodera și colab., 1981). Rezultate interesante au fost obținute în autoimunitatea indusă de o tulpină de tip 1 de reovirus la șoarecii nou-născuți.

Maladia experimentală declanșată de acest virus se manifestă ca o boală poliendocrină autoimună — diabet, tulburări de creștere. Virusul infectează o serie de organe, incluzînd celulele din pituitara anterioară și insulele Langerhans (Bishop, 1983).

Droguri imunosupresoare administrate în momentul inoculării împiedică apariția autoanticorpilor și dezvoltarea sindromului clinic.

La om, *autoanticorpii* au fost puși în evidență după o serie de afecțiuni virale. Autoanticorpi citotoxici față de limfocitele normale au fost semnalați după infecția cu virusurile rubeolic, rujeolic și virusul Epstein-Barr. Autoanticorpi reactivi cu nuclei, mușchi neted, tubuli renali au fost găsiți mai frecvent la bolnavii cu infecții gripale și herpes recidivant decît la martorii normali (Wutzler și colab., 1978). Alte exemple includ : anticorpii față de proteina mielinei la bolnavii cu panencefalită sclerozantă (Panitch și colab., 1980) ; anticorpi antitrombocitari la bolnavii cu rubeolă (Kahane și colab., 1981) ; factorul reumatoid la bolnavii cu virus citomegalic sau hepatită (Stagno și colab., 1980).

Mecanismele prin care virusurile declanșează producerea autoanticorpilor sînt multiple. Astfel, virusurile pot modifica celula infectată sau un component al ei, care devine străin pentru gazdă (Eaten, 1980). Această posibilitate survine în următoarele condiții : dacă virusul încorporează în înveliș antigene ale gazdei ; dacă inserează, expune sau modifică antigenele de suprafață ale celulei-gazdă ; dacă eliberează antigene sechestrate, probabil într-o formă precursoare și pe care sistemul imun o recunoaște ca fiind străină. Deși această ipoteză a celulei-țintă a fost propusă și susținută de mulți autori și, probabil, este implicată în anumite fenomene de autoimunitate induse de virus, nu s-a obținut pînă acum o probă viguroasă care să excludă celelalte mecanisme.

Un alt mecanism prin care virusurile produc autoanticorpi reactivi cu componenții gazdei este prin acțiunea directă asupra sistemului imun, și anume prin activarea policlonală a celulelor B (Ahmed și Oldstone, 1984). Această activare policlonală a celulelor B, care include și producerea de autoanticorpi, însoțește infecțiile acute sau cronice cu numeroase virusuri ADN sau ARN, atît în maladiile experimentale, cît și în cele naturale (Hirsh și Proffitt, 1975).

Virusurile prezină unele asemănări de structuri cu activatori policlonali — substanțe mitogene —, care sînt în general polimeri cu greutate moleculară mare și cu determinante antigenice care se repetă.

Mitogenul viral cel mai bine caracterizat este virusul Epstein-Barr. *In vitro*, acest virus infectează și transformă limfocitele B — care au de obicei o viață limitată — în linii celulare limfoblastoide care proliferează nedefinit și fără intervenția unui stimul străin.

Transformarea și imortalizarea celulelor B cu EBV este strîns legată de activarea policlonală, deoarece virusul inactivat cu raze ultraviolete se poate lega de celule dar nu induce proliferarea lor și secreția de anticorpi. Capacitatea EBV de a acționa ca un activator policlonal al celulelor B *in vivo* prezintă o semnificație considerabilă, pentru că acest virus este agentul etiologic al mononucleozei infecțioase, maladie caracterizată printr-o creștere de anticorpi cu diverse specificități, inclusiv autoanticorpi.

Și alte virusuri pot acționa ca mitogene ale celulelor B *in vitro*, ca de exemplu virusul gripal, virusul stomatitei veziculoase, adenovirusul, virusul Sindbis (Butchko și colab., 1978; Goodman și colab., 1980; Gibson și colab., 1982). Cu excepția virusului herpes simplex, infectivitatea acestor virusuri nu este necesară pentru activarea celulelor B, fapt care sugerează că mitogenitatea este datorită unei proteine structurale a virionului.

Virusurile mai pot induce activarea policlonală a celulelor B prin distrugerea celulelor T supresoare sau stimularea limfocitelor T ajutătoare. Celulele Ts care reglează funcția producerii de anticorpi — care sînt antigen-specifici și nespecifici — pot fi infectate de virusuri. Antigenele de suprafață exprimate pe acest subset de celulă T pot acționa ca receptori pentru atașarea virală. Multiplicarea virusului duce la inactivarea celulelor Ts, deci la o producere crescută de anticorpi.

Activarea policlonală a limfocitelor B prin stimularea celulelor Th are loc în timpul infecției acute cu virusul coriomeningitei limfocitare. Durata necesară celulelor Th specifice virusului de proliferare în ganglionii limfatici și splina șoarecilor infectați este paralelă cu rata de creștere a numărului de celule care secretă Ig. La șoarecii nuzi, atimici, se produc anticorpi specifici, dar activarea policlonală a limfocitelor B este absentă.

Activarea policlonală a limfocitelor B, în acest caz, este mediată de factori de diferențiere, eliberați de celulele Th specifice virusului. Majoritatea virusurilor induc un răspuns marcat de celule T, care include și activarea celulelor Th specific virale (Mims, 1982). Acești factori de diferențiere eliberați de celulele Th specifice acționează numai asupra limfocitelor B care au primit primul semnal de la antigenul specific viral (Gould și colab., 1983).

O implicație majoră a activării policlonale a limfocitelor B indusă de virus este posibilitatea declanșării unei boli autoimune și a apariției de complexe antigen — anticorp circulante. În timpul infecțiilor virale acute, răspunsul autoimun este tranzitoriu dar, în infecțiile cronice cu virus persistent, există o producere continuă de autoanticorpi cu potențial distrugător față de celulele și țesuturile care poartă antigene *self* care sînt recunoscute.

Un al treilea mecanism prin care virusurile pot declanșa răspunsurile autoimune este mimetismul molecular. Virusurile pot avea comun cu antigenele celulare de suprafață unele secvențe de aminoacizi, care explică de ce anticorpii față de unele antigene virale reacționează încrucișat cu antigenele celulare normale. Studiile cu anticorpi monoclonali au adus probe evidente în acest sens. Astfel, reacții încrucișate au fost evidențiate între unele proteine ale virusului rujeolic și virusului herpes simplex și filamentele intermediare umane (Fujinami și colab., 1983). În alte experiențe, anticorpii monoclonali față de antigenul T al SV40 reacționează cu proteine din celula-gazdă normală (Crawford și colab., 1982).

Anticorpi monoclonali neutralizanți pentru virusul Coxsackie B4 reacționează cu miocardul de șoarece, fapt deosebit de interesant deoarece acest virus produce miocardită și s-a presupus cu mult înainte că autoimunitatea poate fi implicată în patogeneza acestei boli (Woodruff, 1980).

Un al patrulea mecanism prin care virusurile pot declanșa un răspuns autoimun este prin producerea de anticorpi antiidiotipici (idiotip = antigenitatea situsului de combinare a anticorpului).

De exemplu, anticorpii față de idiotipul anticorpului antihormon reacționează nu numai cu anticorpul antihormon, dar și cu receptorii pentru hormon de la nivelul suprafeței celulare (Sege și Person, 1980). Acest fapt presupune că anticorpul antiidiotip recunoaște un determinant comun al receptorului și anticorpului antihormon. Observații similare au fost făcute și pentru reovirus (Nepom și colab., 1982). Anticorpul antiidiotip care reacționează cu anticorpul față de hemaglutinina virală recunoaște și receptorii virali de la suprafața limfocitelor sau a celulelor nervoase.

Tehnologia hibridomului a făcut posibil să se studieze și să se aprofundeze autoimunitatea indusă de virus. De exemplu, hibridoamele obținute cu splina de la șoarecii infectați cu reovirus dau un număr mare de anticorpi monoclonali (Haspel și colab., 1983). Anticorpii monoclonali reacționează cu mai multe organe comparativ cu serurile obținute la șoarecii infectați. Deoarece capacitatea limfocitelor B de a produce autoanticorpi preexistă infecției, se presupune că autoanticorpii fac parte din repertoriul limfocitelor normale, iar infecția virală, prin mecanismele discutate, declanșează secreția acestor autoanticorpi.

În concluzie, autoanticorpii au fost puși în evidență în serurile animalelor și bolnavilor după unele infecții virale. Nu se poate încă preciza dacă acești autoanticorpi au rol în patogeneza bolii sau sînt un epifenomen. Date interesante vor fi aduse și de răspunsurile autoimune mediate de celule care sînt încă la început.

Dezvoltarea tehnologiei hibridomului, noile metode de studiu ale imunoreglării și tehnicile ADN recombinant vor da posibilitatea unor studii mai complexe asupra virusurilor cunoscute și necunoscute încă a fi agenți cauzali ai bolilor autoimune.

Bibliografie selectivă

DEINHARDT F., GUST I. D. — Bull. World Health Organ., 1982, 60, 661—691.

HERBERMAN (red.) — NK Cells and Other Natural Effector Cells, Academic Press Inc., New York, 1982.

KLEID D. G., YANSURA D., SMAL B. şi colab. — Cloned viral protein vaccine for foot and mouth disease, Science, 1981, 1 125—1 129.

LIU C. C., YAMSURA D., LENINSON A. D. — Direct expression of hepatitis B surface antigen in monkey cells from an SV40 vector, DNA, 1982, 1, 213—221.

MANDEL B. — Neutralization of Animal Viruses, în Advances in Virus Research, vol. XXIII, p. 25, Academic Press Inc., New York, 1978.

MORARU I. — Imunologie, Edit. Medicală, Bucureşti, 1984.

SISSONS J. G. P., OLDSTONE M. B. A. — Antibody mediated destruction of virus-infected cells, Adv. Immunol., 1980, 29, 209—260.

* * * — Basic and Clinical Immunology, ed. a II-a, Fudenberg H. H., Stites D. P., Caldwell J. L. şi Wells J. V. (red.), Lange Medical Publishers, Los Altos, 1978.

* * * — Concepts in Viral Pathogenesis, Notkins A. L. şi Oldstone B. A. (red.), Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1984.

* * * — Comprehensive Virology, Fraenkel-Conrat H. şi Wagner R. R. (red.), vol. XV, Plenum Press Inc., New York, 1979.

* * * — Immunological Recognitions and Effector Mechanisms in Infectious Diseases, Torrigiaini G. şi Bell R. (red.), Schwabe and Co., Benno, Basel, 1979.

* * * — Viral vaccines, Raport OMS, Seria Rapoarte tehnice, p. 693, 5—9.VII.1982.

11

Vaccinuri virale

11.1. GENERALITĂŢI

Conceptul de bază în combaterea bolilor virale este întreruperea lanţului epidemiologic prin acţiuni vizînd căile de transmitere sau susceptibilitatea gazdei. Ultimul obiectiv se realizează prin vaccinare, cea mai importantă metodă medicală de combatere specifică a bolilor infecţioase la ora actuală.

Istoricul vaccinării este legat în primul rînd de viroze : primul vaccin a fost cel antivariolic (Jenner, 1798) iar prima infecţie umană eradicată a fost o viroză : variolă (1980). Nume ilustre marchează contribuţia vaccinurilor în lupta pentru lichidarea bolilor infecţioase. Iată cîteva momente marcante în evoluţia vaccinurilor :

1798 — *Jenner* — vaccinarea în variolă
1885 — *Pasteur* — vaccinarea în rabie
1892 — *Haffkin* — vaccinarea în holeră
1913 — *Behring* — imunizarea antidifterică, perfecţionată de Ramon, 1923
1921 — *Calmette şi Guérin* — vaccinarea în tuberculoză
1927 — *Ramon şi Zoeller* — vaccinarea în tetanos
1937 — *Theiler* — vaccinul atenuat amaril
1938 — *Smorodinţev* — vaccinurile gripale
1954 — *Salk* — vaccinurile polio inactivate
1957 — *Sabin* — vaccinurile polio vii, atenuate
1961 — *Enders* — vaccinarea în rujeolă
1962 — *Weller* — vaccinarea în rubeolă
1976 — *Krugman* — vaccinarea în hepatite virale
1980 — vaccinuri sintetice obţinute prin bioinginerie, peptide sintetice ca vaccinuri virale, vectori virali pentru vaccinuri hibride, imunizare cu anticorpi antiidiotip.

Vaccinurile virale pot conţine fie agenţi activi — ***vaccinuri vii*** —, fie virusuri inactivate sau fracţiuni virale — ***vaccinuri inactivate***. Independent de imunogenul conţinut, un bun vaccin trebuie să inducă o rezistenţă specifică similară bolii naturale, fără simptome clinice sau disconfort.

11.1.1. VACCINURI VIRALE VII

Vaccinurile virale vii sînt întrebuinţate în una din următoarele alternative :

a) utilizînd virusuri înrudite antigenic dar nevirulente pentru gazda respectivă, avînd clasicul exemplu jennerian — virusul vaccinal în variolă. În medicina veterinară această modalitate este frecvent folosită : virusul fibromului Shope în mixomatoza iepurelui, virusul jigodiei în pesta bovină etc. ;

b) utilizînd tulpini cu virulență scăzută — vaccinuri vii atenuate. Selecția tulpinilor atenuate sau hiperatenuate s-a realizat prin mai multe metode :

— selecție clonală ;

— selecție sub acțiunea presorilor fizici (temperaturi sub- sau supraoptimale de cultivare) ; chimici (condiționări de mediu) ; biologici (substrat celular depărtat filogenetic de gazda naturală) ;

— selecția unor tulpini atenuate natural (de exemplu, tulpinile Sabin folosite în vaccinarea antipoliomielitică orală) ;

c) utilizînd virusul neatenuat sau cu reactogenitatea puțin modificată, inoculat însă simultan (dar în alt loc) cu antiserul sau imunoglobuline specifice. Metoda vaccinării asociate : virus + ser imun a fost utilizată în vaccinarea antiamarilă sau antirujeolică și rămîne încă actuală în profilaxia rabiei după expunere (metoda Babeș) ;

d) utilizînd virusul neatenuat pe căi de inoculare diferite de poarta de intrare naturală ; de exemplu, adenovirusurile administrate oral în capsule enterice. Ultimele două metode au fost folosite limitat, datorită riscului determinat de reactogenitatea virusurilor neatenuate și, mai ales, pericolului de diseminare a virusurilor de la vaccinați în colectivitate.

Avantajele vaccinurilor vii vor fi relevate în comparație cu vaccinurile inactivate. Pînă atunci, vom enumera calitățile care trebuie întrunite de un *vaccin viral viu ideal :*

— capacitate de replicare suficientă pentru determinarea unei imunizări puternice, similare răspunsului imun umoral, celular și local din boala naturală ;

— areactogenitate ;

— absența excreției de virus de la vaccinați în colectivitate sau

— stabilitatea markerilor de atenuare în cursul trecerilor repetate interumane ;

— absența persistenței virale și a riscului oncogen (teoretic) propriu unor virusuri ;

— modalitate simplă de administrare (preferabil pe căile naturale de intrare a virusului) într-o formă acceptată de public ;

— absența unor agenți contaminanți, criptici sau oncogeni, din substratul de producție al vaccinurilor ;

— costul și beneficiile vaccinării trebuie să fie net avantajoase comparativ cu costul și riscul bolii naturale respective.

11.1.2. VACCINURI VIRALE INACTIVATE

Vaccinurile virale inactivate sînt preparate conform principiului general al distrugerii virulenței, cu conservarea determinanților antigenici esențiali pentru inducerea unui răspuns imun protector. Este general acceptat că un bun vaccin inactivat nu poate fi obținut decît dintr-o suspensie virală cu titru înalt. Ținînd seama că majoritatea vaccinurilor virale sînt preparate în culturi celulare, s-au depus eforturi deosebite pentru dezvoltarea unei metodologii apropriate dezideratului sporirii concentrațiilor virusului cultivat. Ca urmare, s-au pus la punct sisteme *in vitro* în care se produc cantități de celule de ordinul gramelor sau kilogramelor. În principiu, există două tipuri de sisteme care produc fie celule în suspensie, fie aderente la substrat. În prima categorie mai cunoscute sînt : sistemele cu agitație continuă și diferite fermentatoare (citostat, citoregenerator, unitate trofocel etc.). Culturile dependente de substrat, inițiate de Earle și Highhouse, includ : sticlele roller, flacoanele cu discuri de titaniu, culturi obținute pe microbile etc. Tehnologia culturii de celule în masă constituie, în prezent, o specialitate bine conturată a biologiei aplicative, indispensabilă producției unor biopreparate diverse. Totodată, a progresat standardizarea culturilor utilizate, a mediilor și containerelor aferente (Cernescu și Sărățeanu, 1972).

Agenții inactivanți utilizați au făcut obiectul unor cercetări riguroase, din cauza dificultății de a se discrimina între pierderea infectivității și completa denaturare a antigenelor. Între agenții fizici inactivanți menționăm : căldura, razele ultraviolete, gamma, röntgen, ultrasunetele. Și mai mare este varietatea agenților chimici : fenol, formol, freon, percloretilena, β-propiolactona, acetiletilenimida etc.

Acțiunea formolului — agentul cel mai larg folosit — se exercită la nivelul capisdei proteice. Concentrațiile mici utilizate (1/4 000) își epuizează acțiunea la nivel capsidar, difuziunea către interiorul particulei fiind minimă. Ruperea fizică a capsidei trebuie evitată, pentru că se însoțește de o pierdere semnificativă în imunogenitate. Curba de inactivare, în limitele unor parametri determinați, are un aspect bifazic, cu o scădere inițială marcată a titrului și o inactivare lentă ulterioară. Coordonatele acestei curbe trebuie atent urmărite, întrucît reproducerea lor cu ocazia fiecărei operații de inactivare este o condiție *sine qua non* în prepararea vaccinurilor de acest tip.

Studiile clasice românești (Babeș, Pușcariu) au urmărit acțiunea inactivantă a căldurii în prepararea vaccinului rabic. Mai recent, a fost studiată acțiunea inactivantă a metalelor grele (argint, cupru, aur platină) asupra virusului rabic (Duca). Nicolau a extins metoda obținerii vaccinurilor metalizate în encefalita de căpușe, herpes etc.

Progrese importante au fost realizate, în ultima decadă, în purificarea și concentrarea structurilor antigenice ale unor virusuri. Fracțiuni subvirale, respectiv hemaglutinine din virusul gripal, urlian, rujeolic, au fost testate în Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau“ ca posibile vaccinuri inactivate. Contribuția biotehnologiei în direcția obținerii vaccinurilor subvirale este detaliată în secțiunea următoare.

Numeroși autori au făcut considerații asupra opțiunii vaccinuri vii — vaccinuri inactivate. Nicolau a fost un susținător fervent al vaccinurilor vii, arătînd că numai ele induc o rezistență specifică similară bolii naturale. În raport cu fiecare viroză se pot face aprecieri asupra avantajelor și problemelor ridicate de vaccinul viu sau inactivat iar adoptarea unei variante este de competența autorităților naționale de sănătate publică.

Avantajele vaccinurilor vii sînt redate pe scurt :

— inducția rapidă (după doză unică, de cele mai multe ori) a unei imunități umorale, celulare și locale persistînd toată viața ;

— imunitatea indusă are un spectru antigenic larg ;

— administrarea se face de multe ori pe căi naturale, fiind ușor acceptată ;

— vaccinarea este ieftină, atît din punctul de vedere al producției (randament ridicat), cît și al administrării (nu necesită personal calificat) ;

— folosind în preparare celule diploide umane (HDC), se obține un produs cu grad sporit de securitate în raport cu eventualii agenți contaminanți ai substratului.

Problemele ridicate de vaccinurile vii țin de riscul (teoretic) al retromutațiilor tulpinilor atenuate către virulență. Excreția de virus la vaccinați și difuzarea lui în colectivitate pot facilita aceste retromutații. Uneori, vaccinul viu poate fi interferat de multiplicarea concomitentă a altor virusuri. În fine, vaccinul viu este contraindicat la imunosupresați, imunodeficienți și la contacții acestora.

Vaccinurile inactivate necesită doze repetate și rapeluri periodice pentru a menține un nivel imunitar satisfăcător. Acest inconvenient este compensat în oarecare măsură de posibilitatea asocierii mai multor vaccinuri inactivate în vaccinări polivalente simultane. Imunitatea indusă este uneori limitată la seroconversie, ceea ce nu întrerupe circulația virusurilor respiratorii sau enterice. Randamentul mic în producție, tehnologiile pretențioase, inoculările multiple fac vaccinurile inactivate deosebit de costisitoare.

Singurele avantaje specifice vaccinurilor inactivate țin de gradul de securitate mai mare (lipsesc posibilitățile de reactivare a virulenței) și de indicația administrării lor la imunodeficienți.

În concluzie, estimarea avantajelor și problemelor fiecărei proceduri trebuie să fundamenteze opțiunea. Nici o intervenție medicală nu este fără risc. Chiar cele mai anodine medicamente implică un risc personal. Cu atît mai mult trebuie judecat riscul potențial al unor măsuri de sănătate publică.

11.2. NOI TEHNICI ÎN PRODUCEREA VACCINURILOR VIRALE

Paralel cu atenția acordată optimizării vaccinurilor actuale — vii, inactivate sau subunitare —, biotehnologia modernă oferă alternative ce promit o adevărată revoluție în prepararea vaccinurilor.

Două tehnologii prezintă un interes particular : *producția anticorpilor monoclonali* și producția de proteine și polipeptide prin *metodologia ADN recombinant.* Anticorpii monoclonali reprezintă un instrument deosebit de specific pentru analiza antigenelor virale și pentru selectarea acelor determinanți, esențiali în imunogeneză, care trebuie incluși în vaccinuri. Pe de altă parte, noile tehnici din chimia acizilor nucleici (hibridări, secvențierea oligonucleotidică etc.) au permis identificarea fragmentelor genomice responsabile de sinteza unor subunități virale antigenice. În tehnologia ADN recombinant fragmentele genomice (genele) care codifică polipeptide antigenice esenţiale pentru imunogenicitatea virusurilor sînt inserate în vectori apropriaţi. Vectorii sînt, de obicei, acizii nucleici infecţioşi ai unor plasmide sau virusuri. Cu ajutorul vectorilor, genele sînt transferate în gazde noi, nenaturale, ca bacterii, levuri sau culturi celulare. Exprimarea funcţională a acestor gene în noile condiţii a condus la sisteme de sinteză a unor antigene virale în cazul unor virusuri care cultivă greu în condiţii experimentale (de exemplu, antigenele virusului hepatitei B).

Anticorpii monoclonali au putut defini lanţuri poli- sau oligopeptidice foarte scurte, care determină epitopii relevanţi pentru imunogenicitatea unor virusuri. Producţia unor lanţuri scurte de aminoacizi este realizabilă tehnic şi economic prin sinteză chimică, în timp ce producţia lanţurilor lungi ale antigenelor complete este dificilă şi neeconomică. S-a deschis astfel calea producerii vaccinurilor virale sintetice.

Tehnologia ADN recombinant s-a dovedit fructuoasă şi pentru obţinerea unor tulpini atenuate, cu perspective pentru includerea în vaccinurile virale vii. Cartografierea genomică a virusurilor permite inducţia unor mutaţii în puncte predeterminate ale genomului, în vederea selecţiei unor tulpini defective în determinanţi ai virulenţei.

Cel mai important impediment în calea introducerii rapide în practică a vaccinurilor preparate prin inginerie genică sau sinteză chimică este imunogenitatea limitată a antigenelor foarte simplificate. Aceste antigene trebuie încorporate în *adjuvanţi* imunologici siguri şi eficienţi. Acţiunea adjuvantului este asociată în special cu trei fenomene : stabilizarea antigenului la locul de inoculare ; formarea de noi focare sintetizatoare de anticorpi (granuloame) ; sensibilizarea persistentă. Principalii adjuvanţi clasici utilizaţi în clinică sînt gelurile din săruri de aluminiu. Antigenele sînt precipitate sau adsorbite pe geluri preformate de hidroxid sau fosfat de aluminiu. O alternativă modernă este reprezentată de *lipozomi*. Antigene virale simplificate pot fi încorporate în fosfolipide, avînd structuri stabile, numite lipozomi, care acţionează ca adjuvanţi siguri şi eficienţi. În acelaşi sens, s-a testat posibilitatea agregării antigenelor (virusului hepatitei B) în micelii proteice prin cuplarea cu lanţuri proteice mai lungi, care expun preferenţial epitopul dorit.

11.3. STANDARDIZAREA ŞI SECURITATEA VACCINURILOR

Toate vaccinurile de uz uman trebuie controlate din punctul de vedere al inoculării imediate şi tardive. În efortul asigurării unor produse comparabile, OMS elaborează periodic recomandări pentru producţia şi controlul vaccinurilor virale. Aceste recomandări cuprind norme care pot fi grupate în trei categorii, după scopul urmărit : *1)* controlul materiilor prime ; *2)* metoda de fabricare şi *3)* probe făcute pe produsul final.

Manualele OMS pentru testarea vaccinurilor virale includ liste cu sursele cele mai autorizate pentru obţinerea echipamentului, chimicalelor, tulpinilor virale și culturilor celulare necesare în producția de vaccinuri. În ceea ce privește testele generale aplicate produsului final, ele se referă la : sterilitate, inocuitate, conținut în aluminiu (sau alți adjuvanți), pH, prezervanți, opacitate, conținut uscat, formaldehidă liberă (pentru vaccinurile inactivate). Recomandări adiționale sînt făcute pentru fiecare vaccin în parte. În cazul vaccinurilor virale vii, un control deosebit de important se referă la potența vaccinului (respectiv, titrarea virusului), care trebuie efectuată în condiții bine precizate (temperatură, substrat, diluent etc.). Potența vaccinurilor inactivate se apreciază după imunogenitatea la animale. Un calculator mic de buzunar poate fi adaptat pentru exprimarea potenței selective a vaccinurilor inactivate prin ceea ce se numește *„Probit Analysis"*.

Normele de standardizare și securitate ale vaccinurilor sînt revăzute periodic de comitete de experți OMS și modificate pentru a reflecta progresele tehnice în materie. Ultimele indicații pot fi găsite în Rapoartele tehnice OMS : nr. 658/1981 pentru vaccinul poliomielitic ; 673/1982 pentru vaccinul rujeolic ; 658/1981 pentru vaccinul în hepatita B ; 594/1976 pentru vaccinul antiamaril etc. Ținînd seama de posibilitatea că în viitorul apropiat antigenele obținute prin inginerie genetică sau sinteză chimică vor intra în componența unor vaccinuri virale, noi norme tehnice de producție și control vor trebui elaborate. Este bine să subliniem problemele delicate ridicate de acceptarea unui vaccin nou considerat mai avantajos decît un vaccin care este utilizat în mod curent și care dă rezultate acceptabile. Omologarea noului produs întîrzie, de regulă, pînă cînd inocuitatea lui este probată la scară largă, știut fiind că fenomenele adverse rare legate de vaccinare apar o dată la 10^5—10^6 doze aplicate.

În țara noastră, modalitatea de acceptare a unui nou vaccin ca și a altor produse biologice este specificată în Legea sănătății. Tot aici sînt stabilite competențele și responsabilitățile pentru producția, controlul și aplicarea vaccinurilor.

11.4. STRATEGIA APRECIERII VACCINURILOR ÎN TEREN

Valoarea economică și socială a vaccinării ca mijloc de prevenire a bolilor infecțioase este evident argumentată pentru fiecare dintre vaccinurile aplicate în mod curent. Raportul avantaje/cost pentru programele de imunizare este net superior oricăror alte metode medicale. De exemplu, în S.U.A. se apreciază că programul de imunizare antirujeolică reprezintă numai 1/10 din cheltuielile sociale care ar fi fost reclamate de boala naturală. Economia anuală este în jur de 500 milioane dolari. Pentru țările în care rujeola determină cifre de morbiditate și mortalitate mai mari, costul vaccinării este de 1/20 din costul bolii în lipsa imunizării.

Pentru realizarea optimă a beneficilor vaccinării, este necesară aplicarea susținută la scară mondială. Numai o astfel de realizare poate determina eradicarea unor boli infecţioase, aşa cum s-a demonstrat în cazul variolei.

Organizaţia Mondială a Sănătăţii a lansat în 1976 *Programul lărgit de Vaccinări* (PLV), al cărui obiectiv este de a imuniza fiecare copil împotriva a şase boli infecţioase : difterie, tuse convulsivă, tetanos, rujeolă, poliomielită şi tuberculoză. Pînă în 1981 numai 21% din potenţialii primitori au fost vaccinaţi, iar în 1990 atingerea procentului de 100% reprezintă o sarcină extraordinară. Se estimează însă că beneficiul se poate măsura, între altele, în prevenirea a 5 milioane de decese anual. În acest program au fost incluse numai vaccinuri foarte ieftine. Costul actual al unei vaccinări în PLV este de 70 cenţi, la care trebuie adăugate cheltuielile de administrare în sine, ceeea ce ridică costul total al imunizărilor la 10 dolari pe copil.

În plus, un alt program iniţiat de OMS priveşte dezvoltarea unor noi vaccinuri. În primul rînd sînt vizate boli larg răspîndite, cum ar fi hepatitele, virozele respiratorii, diareile virale etc. Folosirea biotehnologiei moderne promite transpunerea în practică şi a acestui program.

Pentru realizarea obiectivelor ambiţioase de eradicare a unor boli este foarte importantă acţiunea autorităţilor naţionale pentru asigurarea administrării vaccinului unei proporţii cît mai mari dintre copii. În unele boli virale (rujeolă, poliomielită) numai vaccinarea a peste 95% dintre susceptibili poate conduce la întreruperea transmiterii naturale a bolii respective. Există numeroase metode de evaluare a eficienţei aplicării vaccinurilor în teren. În toate cazurile se testează serologic acoperirea vaccinală. Selecţia grupei de copii care urmează să fie investigată (mărimea lotului, vîrsta care prezintă interes, distribuţia în teritoriu) are o mare însemnătate pentru obţinerea unor rezultate de încredere. Simularea pe computer a fost de asemenea testată pentru aprecierea performanţelor diferitelor metode de supraveghere sero-epidemiologică.

Concluziile analizei activităţii sistemelor actuale de supraveghere relevă capacitatea limitată a acestora de a semnala numai aspecte neobişnuite în incidenţa unor viroze. Problema este de a se iniţia prompt măsuri corective corespunzătoare necesităţilor. De aceea, orice măsuri alternative sau complementare mecanismelor de supraveghere actuale sînt recomandate : reţele-sentinelă, programe specifice (incidenţa handicapării postpoliomielitice, de exemplu), campanii suplimentare de imunizare etc.

11.5. CONTRAINDICAŢIILE VACCINĂRILOR

Hotărîrea de a exclude de la vaccinare un copil care a ajuns la vîrsta apropiată nu trebuie luată cu uşurinţă. În teren, personalul medical este confruntat cu liste lungi de contraindicaţii care, în cazul în care sînt urmate întocmai, privează de vaccinare o proporţie considerabilă dintre potenţialii primitori. De aceea, un grup consultativ al OMS a elaborat o serie de recomandări generale care au fost prezentate şi celui de-al XXVII-lea Congres Internaţional de Pediatrie, din 1984. Reproducem indicaţiile cu caracter general şi cele vizînd vaccinurile virale incluse în *Programul Lărgit de Vaccinări :*

— Rețeaua de sănătate publică nu trebuie să neglijeze nici o ocazie pentru a vaccina copii care întrunesc condițiile medicale și de vîrstă.

— Vaccinul poliomielitic oral poate fi administrat începînd cu a 6-a săptămînă de viață (la fel, vaccinul diftero-tetano-*pertussis*) și în unele cazuri chiar mai devreme. Vaccinul rujeolic viu atenuat poate fi administrat încă din a 9-a lună de viață. Vaccinarea timpurie este indicată mai ales în țările în care datele epidemiologice relevă frecvența acestor boli la grupa de vîrstă sub 1 an.

— Nici un vaccin nu este lipsit total de reacții adverse, dar riscul complicațiilor grave datorate vaccinării este mult mai mic decît cel ce urmează infecției naturale.

— Decizia de a renunța la vaccinare nu trebuie luată decît după o evaluare atentă a consecințelor care pot rezulta atît pentru individ, cît și pentru colectivitate.

— Este deosebit de important de a vaccina copii malnutriți. O febră ușoară, infecții respiratorii sau diarei benigne, la fel ca și alte afecțiuni intercurente fără gravitate nu constituie o contraindicație nici în cazul copiilor malnutriți.

— Decizia de a vaccina un copil a cărui stare de sănătate necesită spitalizarea este de competența medicilor din spital.

— Statusul vaccinal al copiilor spitalizați trebuie evaluat înainte de externare și se vor administra vaccinurile apropriate. Uneori este indicată vaccinarea la internare, pentru a evita riscul unei infecții intraspitalicești (rujeolă, de exemplu).

— Diareea nu este o contraindicație pentru vaccinarea antipoliomielitică orală. Pentru a garanta o protecție totală, dozele administrate la copii cu diaree nu vor fi însă considerate ca făcînd parte din posologia normală, administrîndu-se cu prima ocazie doze suplimentare.

Recomandările în materie de contraindicații sînt de competența autorității naționale pentru controlul serurilor și vaccinurilor, care trebuie să se bazeze pe avizul unui grup reprezentativ de specialiști. De asemenea, recomandările trebuie periodic revăzute în funcție de nivelul rețelei, acceptabilitatea socio-culturală a populației, posibilitățile practice de urmărire a exceptaților și eventual de rechemare a lor pentru imunizare.

Cîteva considerații suplimentare pot fi făcute referitor la vaccinurile vii. Acestea sînt contraindicate în mod absolut bolnavilor sub tratament imunosupresiv, ca și celor care suferă de boli maligne (în special ale sîngelui și organelor limfopoietice). De asemenea, primul trimestru al sarcinii, cînd există posibilitatea unor leziuni embrionare viral-induse, contraindică vaccinarea. Administrarea recentă de imunoglobuline, alte vaccinări sau faza acută a unor boli infecțioase impun amînarea (30 de zile) vaccinării.

Anumite condiții, febra și sindroame neurologice în particular, care apar și spontan la copii neimunizați, nu trebuie să contraindice vaccinarea decît la indicația expresă a medicului. Convulsiile, de exemplu, survin uneori după vaccinarea antirujeolică, însă este greu să se estimeze relația cauzală sau coincidentală convulsii — vaccinare. Într-un studiu american, frecvenţa „spontană" a convulsiilor la vîrsta de 3—15 luni este de 0,8—1,4% lunar, iar la vaccinaţii antirujeolic (în prima lună după vaccinare) — între 2—19‰.

În concluzie, vaccinurile virale actuale prezintă un grad înalt de securitate, iar complicaţiile care survin sînt de mii de ori mai rare decît cele ce urmează bolii naturale. Întîrzierea sau nevaccinarea copiilor bolnavi, malnutriţi sau în ajunul spitalizării este o optică depăşită. De multe ori, tocmai aceşti copii au nevoie mai mare de vaccin, căci bolile care pot fi prevenite de vaccinare au la ei un final tragic.

11.6. CALENDARUL VACCINĂRILOR

Necesitatea unei ordini cronologice între diferitele vaccinări s-a făcut simţită în anii '60, cînd noi vaccinuri (în special virale) au intrat în uz. Cu această ocazie s-a creat noţiunea de calendar al vaccinărilor. Alcătuirea calendarului trebuie să ţină seama de raţiuni epidemiologice şi administrative şi în acelaşi timp de principii imunologice şi de reactivitate clinică.

Pentru a se putea defini ordinea ideală, a fost necesar să se precizeze vîrsta la care copilul începe să fie expus la diferite infecţii şi cînd începe să reacţioneze la imunizările specifice. Nou-născutul, datorită transferului transplacentar al anticorpilor materni, este protejat pasiv în primele 3—6 luni. Pe de altă parte, aptitudinea de a sintetiza anticorpi este pe deplin formată numai după primele 6—8 săptămîni de viaţă.

Majoritatea vaccinurilor existente vizează profilaxia specifică a unor infecţii care ameninţă copilul încă în primul an al vieţii. Pentru a fi oportune, imunizările trebuie aglomerate în acest interval scurt de timp. În unele cazuri, vaccinarea comportă o *vaccinare primară* şi o succesiune de *revaccinări (rapeluri)* care condiţionează obţinerea şi durata protecţiei specifice. Un element esenţial în alcătuirea calendarului vaccinărilor este respectarea intervalului dintre vaccinarea primară şi revaccinare. Este util să se înceapă cît mai precoce, pentru ca vîrsta incidenţei maxime a unor infecţii să găsească copilul cu schema de administrare a vaccinurilor încheiată. În plus, între vaccinuri diferite există intervale libere minime care trebuie respectate. Ca o alternativă la acest ultim deziderat, există posibilitatea administrării simultane a mai multor vaccinuri (vaccinuri polivalente).

Ordinea stabilită pentru administrarea vaccinurilor şi vîrsta, sugerate de calendarul vaccinărilor, nu sînt infailibile. În funcţie de aspecte neprevăzute care solicită reţeaua sau de indisponibilităţi temporare ale individului se pot reformula schemele de imunizare. Important este ca toate vaccinurile să fie administrate în posologii complete şi în intervale cît mai apropiate de cele optime. Înscrierea vaccinărilor în fişele individuale de sănătate este o condiţie pentru accesul în şcoală. Eforturi trebuie încă depuse pentru creşterea numărului de vaccinări la adulţi. Numeroase vaccinuri noi (gripale, hepatitice etc.) sînt destinate administrării unor categorii de indivizi din populaţia adultă cu risc profesional sau medical. Creşterea încrederii în beneficiile vaccinării, educaţia sanitară, recomandările medicale vor trebui să contribuie la utilizarea extensivă a vaccinurilor noi.

11.7. CERTIFICATE INTERNAŢIONALE DE VACCINARE

Certificatele internaţionale de vaccinare atestă imunizarea fiecărui călător împotriva unor boli transmisibile care prevalează în ţările de unde începe călătoria, în ţările de tranzit şi în cele terminus. În prezent, autorităţile sanitare naţionale pretind astfel de certificate pentru imunizarea antiamarilă (febră galbenă) şi antiholerică, în funcţie de regiunile endemice semnalate săptămînal de OMS. Certificatele de vaccinare sînt individuale, indiferent de vîrsta subiectului ; ele sînt imprimate în engleză, franceză şi arabă după un model unic. Vaccinarea antiamarilă se face numai în centre atestate de OMS, cu vaccin de asemenea autorizat de OMS. Valabilitatea certificatului este de 10 ani pentru febră galbenă (începînd din a 10-a zi de la prima vaccinare) şi de 6 luni pentru holeră (decurgînd din a 7-a zi de la vaccinare). În ultimii ani, atestarea vaccinării variolice nu mai este solicitată, datorită confirmării mondiale a eradicării bolii prin proba timpului. Într-o notă inclusă în calendarul de vaccinări se precizează nu numai că vaccinarea antivariolică nu se justifică, dar că este periculoasă. Ţinînd seama de semnificaţia paludismului pentru sănătatea celor ce călătoresc, sînt adăugate menţiuni privind protecţia în această boală.

11.8. VACCINURI ÎN VIROZE SPECIFICE

Tabelele 11-I şi 11-II sintetizează indicaţiile administrării principalelor vaccinuri virale vii, respectiv inactivate. În plus, în tabelul 11-III sînt cuprinse informaţii asupra imunoprofilaxiei antivirale, o metodă auxiliară vaccinării care îşi păstrează în unele cazuri o valoare practică evidentă. În continuare sînt prezentate aspecte actuale ale vaccinurilor curent aplicate, problemele nesoluţionate şi perspectivele oferite de noile tehnologii.

TABELUL 11-I

Vaccinuri virale vii pentru uz uman

Boala	Indicații	Vîrsta administrării	Calea de inoculare	Număr doze	Observații
Variolă	Persoane cu risc	oricare	scarificare	1	Categoriile de risc sînt precizate de autoritățile naționale
Febră galbenă	Persoane cu risc	oricare	subcutanat	1	Vaccinare cerută în certificatele internaționale de vaccinare ale călătorilor
Poliomielită	Toți copiii	6—12 săptămîni	oral	3	Vaccin trivalent compensat
Rujeolă	Toți copiii	9—12 luni	subcutanat	1	
Rubeolă	Toți copiii	peste 1 an	subcutanat	1	
Oreion	Toți copiii	peste 1 an	subcutanat	1	
Gripă	Persoane cu risc vital	oricare	intranazal, *per os*	1—2	Utilizat mai mult în U.R.S.S.
Adenoviroze	Recruți		oral, capsule enterice	1	Utilizat mai mult în S.U.A.

TABELUL 11-II

Vaccinuri virale inactivate încă folosite la om

Boala	Indicații	Cale de inoculare	Număr doze	Observații
Hepatită B	Persoane cu risc	subcutanat	3	Prevenirea infecției neonatale
Poliomielită	Toți copiii	subcutanat	3—4	Vaccin trivalent
Rabie	(vezi capitolul *Rhabdoviridae*)	intramuscular	5 sau mai multe	Vaccin pe celule diploide umane
Gripă	Persoane cu risc	subcutanat; intramuscular	2	Vaccinuri subvirale sau din virionul întreg
Adenoviroze	Recruți	subcutanat	2	Vaccinuri subvirale
Arboviroze	Persoane cu risc	subcutanat	2	În funcție de areal geografic

TABELUL 11-III

Imunoglobulinoprofilaxie antivirală

Profilaxie specifică în :	Indicații	Produsul utilizat	Doza mL/kg
Hepatită A	Contacți în primele 2 săptămîni	Ig standard	0,02
Hepatită B	Inoculări accidentale nou-născuți cu risc*	Ig specifice anti-HBV	0,05—0,07
Rujeolă	Susceptibili (nevaccinați) în primele 6 zile de la contact	Ig standard sau specifice	0,25—0,50
Rabie	În tratamentul post-expunere	Ig specifice	20 UI i.m. și local

* Copiii se imunizează în primele 7 zile de la naștere, doza fiind 0,1—0,2 mL.

11.8.1. VACCINURILE POLIOMIELITICE

Imunizarea antipolio a debutat în 1955, odată cu dezvoltarea vaccinului formolat, de către Jonas Salk. A urmat vaccinul viu atenuat, administrat oral, preparat cu tulpinile lui Albert Sabin. Vaccinul oral a fost utilizat pentru prima oară pe scară largă în U.R.S.S., în 1959, iar în S.U.A. începînd din 1960 —1961. În țara noastră, vaccinul antipoliomielitic oral preparat cu tulpinile Sabin la Moscova a fost administrat pentru prima oară în 1960, la 1 200 de copii, de către Cajal și colab. Ambele vaccinuri, inactivat și viu, sînt încă în uz. Ele induc protecție în moduri diferite. Vaccinul inactivat stimulează seroconversia, dar nu induce anticorpi secretori de tip IgA în faringe și tractul intestinal. Vaccinul oral, viu, induce atît anticorpi serici, cît și locali, ca și în cazul infecției naturale. În condiții epidemice, inducția rapidă a anticorpilor locali și popularea tractului intestinal la vaccinați și la contacții celor vaccinați cu tulpinile atenuate blochează difuzarea virusului sălbatic. Acesta este un avantaj extrem de important și nu unicul al vaccinului oral.

Vaccinul poliomielitic inactivat. Este utilizat azi numai în țări mici și cu o rețea sanitară extrem de eficientă : Finlanda, Suedia, Olanda și unele zone din Canada (Ontario, Noua Scoție). Chiar dacă potența vaccinurilor actuale întrece cu mult pe cea a preparatelor din anii '50, sînt necesare inoculări inițiale repetate (două-trei în primele 6 luni și a patra 6—12 luni mai tîrziu) și rapeluri la fiecare 2—3 ani. Creșterea titrului de anticorpi serici protejează împotriva invaziei sistemului nervos central de către virusul sălbatic. Virusul sălbatic se poate însă replica în tractul intestinal al vaccinaților, ceea ce favorizează difuziunea lui în colectivitate. Un argument invocat de adepții vaccinului inactivat este că, în ciuda scăderii titrurilor serice de anticorpi (în absența rapelurilor), organismul odată imunizat este capabil (datorită memoriei imunologice) să producă foarte rapid şi la titruri mari anticorpi, în cazul expunerii la virusul sălbatic. În ţări ca Finlanda şi Suedia, unde s-a realizat o acoperire vaccinală cu vaccin inactivat, administrat în doze multiple de aproape 100%, poliomielita paralitică a dispărut. Supravegherea virusologică a relevat că circulaţia virusului sălbatic a încetat virtual. De aici şi raritatea acestor *booster*-uri cu virus sălbatic care s-ar putea substitui rapelurilor.

În 1978 au izbucnit însă focare epidemice în Olanda : 110 cazuri de polio tip 1, din care 80 paralitice. Toţi bolnavii erau membrii unei comunităţi religioase care refuzau vaccinarea. A fost un experiment natural interesant care a permis estimarea eşantionului de populaţie care poate întreţine circulaţia virusului sălbatic. Mai mult, au fost raportate cazuri în Canada cu acelaşi subtip izolat în Olanda la membri ai aceleiaşi comunităţi religioase. Doi dintre bolnavii canadieni au fost vizitaţi de persoane din anturajul celor afectaţi în Olanda. Acest episod a relevat că aglomerări de subiecţi susceptibili, chiar în sînul unor comunităţi bine vaccinate cu vaccin inactivat, pot favoriza implantarea virusului sălbatic şi apariţia poliomielitei paralitice (Melnick, 1978 ; Nottay, 1981).

Vaccinul poliomielitic oral. Aplicat în mod curent şi la noi în ţară, are toate avantajele vaccinurilor vii subliniate în prima parte a capitolului. Eficacitatea lui este atît de bună, încît în S.U.A., de exemplu, în ultimii 10 ani, media anuală a cazurilor este sub 10 la o populaţie de peste 220 milioane. O astfel de situaţie era greu de anticipat din datele privind acoperirea vaccinală, pentru că numai 65% din copii au primit schema completă de imunizare. Explicaţia acceptată este replicarea virusului-vaccin în tractul intestinal al primitorilor, excreţia şi difuzarea la contacţii susceptibili ai celor vaccinaţi. Rezultă infecţii inaparente, în urma circulaţiei continue a tulpinilor atenuate care sînt imunizante.

Eficienţa vaccinului oral a permis să se aprecieze că eradicarea poliomielitei este un ţel realizabil. Totuşi, o anumită relaxare în distribuirea vaccinului a fost marcată de o recrudescenţă a cifrelor de morbiditate. Un lucru asemănător s-a întîmplat în cazul vaccinării rujeolice. Numai că, în timp ce morbiditatea prin rujeolă a semnalat rapid deficienţele în vaccinare, circulaţia interumană a tulpinilor atenuate de virus poliomielitic a tamponat în oarecare măsură deficienţele din profilaxie. Pe de altă parte, s-a remarcat o scădere în nivelul anticorpilor la foştii vaccinaţi. Aceasta este fie urmarea intervalului lung de la ultima vaccinare, fie a lipsei contactului cu virusul sălbatic sau atenuat circulant. Există niveluri-limită ale imunităţii intestinale care permit replicarea virusurilor polio. Lipsa acestei bariere intestinale creează un risc real pentru răspîndirea bolii. Reimunizarea o dată la 5—6 ani, cu o doză de vaccin trivalent, este o măsură înţeleaptă.

O altă problemă legată de administrarea vaccinului oral este nivelul scăzut al seroconversiei postvaccinale în ţările tropicale şi subtropicale. Proporţia celor ce răspund la vaccinare este de numai 60% în acest areal, comparativ cu 100% în climatul temperat. Mai multe explicaţii au fost propuse :

— anticorpii din laptele matern ;

— prezenţa unei rezistenţe celulare (absenţa receptorului specific) datorată expunerii timpurii la virusul sălbatic şi la alte enterovirusuri ;

— prezența unui inhibitor nespecific (în salivă) la copiii din zonele tropicale ;

— parazitarea excesivă a tractului intestinal, la acești copii, cu agenți diverși care pot interfera virusul-vaccin etc.

Pentru a soluționa acest eșec s-a propus vaccinarea cu vaccinul inactivat. Vaccinurile inactivate cu potență îmbunătățită, produse recent, permit obținerea unui răspuns satisfăcător după numai 1—2 doze. Alte opțiuni au constat în repetarea dozelor de vaccin oral sau, mai recent, folosirea combinată a vaccinului inactivat și oral. Această ultimă alternativă a fost testată cu succes în Danemarca și în Gaza. Se pare că pentru zonele hiperpopulate și cu circulația excesivă a enterovirusurilor o posologie combinată cu vaccin inactivat și viu, deși costisitoare, va fi necesară pentru suprimarea formelor paralitice (Melnick, 1980).

O altă problemă legată de vaccinarea orală este posibilitatea retromutațiilor către neurovirulență a tulpinilor vaccinante. Datele epidemiologice indică raritatea acestor situații. Paraliziile asociate vaccinării sînt de 1 caz la 11,5 milioane vaccinați sau 1 caz la 3,9 milioane de contacți. Se fac cercetări intense pentru definirea unor markeri care să poată distinge în aceste rare situații dacă virusul vinovat este derivat din vaccin (mai frecvent, tipul 3) sau este virusul sălbatic.

Administrarea vaccinului viu persoanelor cu deficit imun este însoțită de un risc important. Frecvența poliomielitei postvaccinale la acești subiecți este de 100 de ori mai mare decît în restul populației. Din nefericire, diagnosticul deficitului imun nu este stabilit la vîrsta la care se pune problema vaccinării (2 luni).

Deși avem trei decenii de experiență privind vaccinarea antipolio, în momentul de față există încă 40 de țări în curs de dezvoltare unde — cu sau fără programe de vaccinare — poliomielita nu este controlată. Estimări făcute pe baza incidenței handicapaților postpoliomielitici indică o frecvență a paraliziilor similară cu cea înregistrată în epoca prevaccinală. De aceea, în inițiativa OMS privind programul lărgit de imunizare, poliomielita constituie o problemă prioritară.

Pentru enterovirusurile nepoliomielitice nu se cunosc vaccinări. Producerea unor vaccinuri în cazuri selectate este tehnic posibilă. În particular, virusurile Coxsackie B care sînt implicate în miocardite la sugari și suferințe cardiovasculare tardive la adulți constituie o problemă de importanță practică.

11.8.2. VACCINURILE RUJEOLICE

Ca și în alte viroze, vaccinurile inactivate sau cele vii, atenuate reactogene au fost înlocuite de vaccinurile vii hiperatenuate (tulpinile Schwarz, Moraten, Leningrad 16 etc.). Aceste vaccinuri induc seroconversie de durată (teoretic pentru toată viața) după o doză unică. În cazul vaccinării rujeolice, virusul-vaccin nu este eliminat de primitori, ceea ce exclude practic posibilitatea reversiei către virulență a tulpinilor vaccinante consecutiv pasajelor interumane. În același timp însă, lipsa excreției de virus determină lipsa unei creșteri secundare a acoperirii vaccinale, ca în cazul vaccinului poliomielitic oral. Vaccinurile vii hiperatenuate rujeolice se administrează azi, în unele țări, simultan cu vaccinurile vii rubeolice și urliene în condiții de perfectă securitate și fără modificări ale eficacității. Au fost raportate și experimente reușite de imunizări simultane rujeolă — BCG sau rujeolă — variolă și rujeolă — febră galbenă.

Imunizarea anuală a fiecărei generații de copii susceptibili a determinat scăderi ale morbidității ce depășesc 99% din cifrele raportate în epoca prevaccinală. Eliminarea rujeolei indigene a fost raportată în unele țări (S.U.A., Cehoslovacia) și există perspective pentru a considera eradicarea mondială a rujeolei ca un țel realizabil.

Strategia aplicării vaccinării trebuie să urmărească asigurarea unei acoperiri vaccinale la peste 95% din susceptibili la o vîrstă timpurie, cînd rujeola evoluează cu complicații frecvente. În același timp, vaccinarea trebuie amînată după vîrsta de 7—9 luni, cînd copilul pierde anticorpii materni. Vîrsta indicată pentru vaccinare variază în funcție de condițiile demografice, de morbiditate și de condițiile socio-economice între 7 —15 luni, în diferite țări. Trebuie știut că o vaccinare prea timpurie riscă o proporție semnificativă de lipsă de răspuns (datorită anticorpilor materni), ceea ce poate discredita vaccinul și lăsa neprotejați mulți „vaccinați“. În cazul unei astfel de opțiuni, măsura revaccinării, deși costisitoare, este indicată.

Precedentul creat de succesul vaccinării antivariolice și rezultate excelente raportate în unele țări permit aprecierea reală a stadiului actual al acțiunii de eradicare. Rujeola etse mult mai contagioasă decît variola, în schimb virusul este labil și nu poate persista în mediu creînd rezervoare temporare. Elementele majore ale programului de eradicare trebuie să vizeze:

— atingerea și menținerea unui nivel ridicat al acoperirii vaccinale;

— un sistem efectiv de supraveghere care să ateste calitatea vaccinărilor;

— control agresiv și limitarea operativă a focarelor epidemice (adesea de import).

Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau“ a efectuat cercetări de pionierat privind aspecte legate de producția și aplicarea vaccinului rujeolic. Subliniem primele vaccinări efectuate în țară cu vaccin autohton, preparat într-o formulă originală, pe celule diploide umane. De asemenea, Cajal și colab. au inițiat imunizarea antirujeolică pe căi naturale (intranazală, intraconjunctivală), o alternativă cu mari perspective practice.

11.8.3. VACCINUL URLIAN

Multă vreme, oreionul a fost privit ca o infecție benignă, de multe ori inaparentă, care nu justifica introducerea unui vaccin specific în programul general de imunizări. Oportunitatea vaccinării s-a discutat pentru colectivitățile militare, în special cu ocazia unor mobilizări de anvergură. În acest sens, experiența finlandeză din anii '60 cu vaccin inactivat a arătat beneficiul obținut după vaccinare în cadrul forțelor armate. Ulterior, au fost descrise tulpini atenuate avianizate care au constituit sursa unui excelent vaccin viu atenuat (tulpinile Jerill Lynn sau Leningrad 3). La noi în țară, Copelovici și colab. (1962) au produs și aplicat un ovo-vaccin cu o variantă atenuată autohtonă „V".

Vaccinul urlian a fost administrat simultan cu cel rujeolic și rubeolic, obținîndu-se rezultate comparabile cu cele după vaccinarea monovalentă. Rezultatele administrării a peste 30 milioane de doze indică impactul vaccinării nu numai asupra morbidității prin oreion, ci și asupra complicațiilor : meningite, orhite etc.

11.8.4. VACCINUL RUBEOLIC

Vaccinurile vii atenuate constituie o armă profilactică esențială în combaterea rubeolei congenitale. Există cîteva tulpini atenuate care se comportă similar în ceea ce privește seroconversia (peste 95%) și reactogenitatea (sub 10—15%). De notat că tulpina atenuată RA 27/3 Plotkin, întreținută pe celule diploide umane, și-a menținut proprietatea de a infecta pe cale intranazală, ceea ce constituie un avantaj pentru aplicarea și acceptabilitatea vaccinului. O altă tulpină japoneză — TO 336 — este mult mai puțin transmisă transplacentar fătului (Best și colab., 1974).

În cazul vaccinului rubeolic viu s-a semnalat excreția pasageră a virusului de la vaccinați. Rămîne de precizat dacă difuziunea acestuia la contacți (mai ales la gravidele din anturajul copiilor vaccinați) constituie un risc. În schimb, trecerea transplacentară a virusului-vaccin la gravidele vaccinate inoportun a fost cert documentată.

Strategia vaccinării urmărește protejarea femeilor ajunse la epoca fertilității. În cele mai multe țări se vaccinează simultan cu alte vaccinuri toată populația infantilă. În Anglia se preconizează numai vaccinarea fetelor fără anticorpi specifici, la vîrsta de 13 ani. Prima opțiune este mai bună pentru că, determinînd scăderea endemiei rubeolice, influențează indirect și frecvența rubeolei congenitale.

Aplicarea largă a vaccinării a contribuit la scăderea morbidității și întreruperea evoluției ciclice multianuale a epidemiilor. În paralel s-a deplasat și vîrsta incidenței maxime a bolii de la 5—9 ani la 15—24 de ani, deci către perioada fertilă. Vaccinarea femeilor seronegative (și a copiilor acestora) se va face numai după excluderea unei sarcini în evoluție.

11.8.5. VACCINUL GRIPAL

Vaccinarea este singura posibilitate reală de prevenire a gripei. Există vaccinuri inactivate sau vii. Primele conțin virionul întreg sau numai fracțiuni virale (hemaglutinina) purificate. Există o experiență largă legată de aplicarea vaccinurilor inactivate atît sistemic, cît și intranazal. Rezultatele atestă utilitatea imunizărilor, mai ales în cazul în care colectivitățile sînt anual imunizate cu vaccinuri preparate cu tulpini circulante. Pentru obținerea unor rezultate mai bune este important să se elaboreze o strategie epidemiologic fundamentată. Indicațiile autorităţilor de sănătate publică cer aplicarea vaccinării în caz de gripă la populaţia cu risc vital, şi anume bolnavilor cu următoarele afecţiuni :

— boli de inimă dobîndite sau congenitale ;
— boli pulmonare cronice ;
— boli renale cronice cu azotemie şi sindrom nefrotic ;
— diabet sau alte boli metabolice ;
— anemie cronică severă ;
— condiţii care compromit sistemul imun.

O astfel de politică este justificată numai în cazul unui număr limitat de doze de vaccin disponibile. Pentru prevenirea difuziunii epidemice a gripei, o verigă esenţială este imunizarea populaţiei şcolare care are un rol important în transmiterea intrafamilială şi în colectivitate. Necesarul de doze pentru o astfel de acţiune, estimat la nivelul ţării noastre, ar fi de 6 milioane anual.

Experienţa sovietică în folosirea imunizării intranazale cu tulpini atenuate de virus gripal datează din perioada premergătoare ultimului război. Teoretic, aceasta ar fi metoda de elecţie, ţinînd seama de edificarea imunităţii locale şi de posibilitatea vaccinării rapide a unui segment larg al populaţiei. Variaţia antigenică a tulpinilor gripale, instabilitatea genetică în cursul pasajelor în laborator ridică însă probleme deosebite producţiei de vaccin viu. Pasajele seriate în laborator ale tulpinilor izolate de la bolnavi conduc la o pierdere timpurie a patogenităţii şi imunogenităţii. Disocierea dintre patogenitate şi imunogenitate survine între pasajele 4—8 iar pierderea capacităţii de replicare în mucoasa respiratorie şi a imunogenităţii, între pasajele 12—16. Desigur, există variaţii între tipurile antigenice şi nu s-au putut formula explicaţii satisfăcătoare pentru acest fenomen.

Studiile recente de biologie moleculară au stabilit secvenţa completă a aminoacizilor din componenţa hemaglutininei gripale. De asemenea, structura terţiară a hemaglutininei a fost stabilită prin difracţie cu raze X. Anticorpii monoclonali au precizat cinci situsuri antigenice distincte. Rămîne de stabilit semnificaţia epidemiologică a modificărilor la nivel molecular în fiecare situs. Există deci perspective pentru o abordare mai logică a cercetărilor în obţinerea unor variante vaccinante mai bune de virus gripal.

Progrese importante s-au realizat şi în înţelegerea răspunsului imun în gripă. Eficacitatea unor vaccinuri depinde în mare măsură de capacitatea lor de a induce o memorie la nivelul celulelor Th, Tc şi B mnezice, care să le facă rapid reactive la o agresiune naturală a virusului. Este probabil ca modul de administrare, numărul şi volumul dozelor etc. să fie importante din acest punct de vedere. Precizarea reacţiilor încrucişate între diferite subtipuri promite elaborarea unui vaccin cu specificităţi multiple, eficient şi împotriva unor tulpini circulante viitoare. Între timp, utilizarea vaccinurilor inactivate actuale — cu virion întreg sau fracţionat — trebuie extinsă, pentru că asigură o protecţie probată indivizilor expuşi la risc. Indicaţiile periodice ale OMS, obţinute în urma activităţii centrelor naţionale şi regionale de supraveghere în gripă privind compoziţia vaccinurilor gripale în fiecare sezon, constituie deja un element pozitiv.

11.8.6. VACCINURI ADENOVIRALE

Au fost experimentate atît sub forma preparatelor inactivate, vii, cît și a fracțiunilor virale (hemaglutinină purificată). Vaccinurile vii atenuate date *per os* în capsule învelite în gelatină (pentru a evita inactivarea prin aciditatea gastrică) sînt puternic imunogene. Acest mod de administrare a confirmat teoria potrivit căreia multiplicarea adenovirusurilor în tractul intestinal induce o imunitate solidă fără simptomatologie respiratorie. Imunizarea bivalentă — cu adenovirusurile 4 și 7 — efectuată în acest fel a redus incidența episoadelor respiratorii acute în colectivități militare temporare (Pierce, 1968).

Insuficienta atenuare a tulpinilor vaccinante implică riscul excreției de virus de la vaccinați și difuziunea adenovirusurilor în colectivități. Într-un studiu în care vaccinul adeno 4 a fost administrat *per os* la cîte un partener din 39 de cupluri, 70% dintre neprimitori au făcut seroconversie. Problema riscului infecției la contacții cu subiecții vaccinați și discuțiile asupra oncogenității unor adenovirusuri (în condiții experimentale) amînă deocamdată decizia privind introducerea vaccinării adenovirale ca o măsură de rutină.

11.8.7. VACCINURI PARAMYXOVIRALE

Datele epidemiologice sugerează că cea mai importantă categorie de subiecți care trebuie imunizată anti-virus paragripal 3 și anti-virus respirator sincițial (RSV) este reprezentată de copii între 1 și 3 luni iar imunizarea anti-virus paragripal 1 și 2 poate fi amînată.

Au fost experimentate atît preparate monovalente, cît și polivalente, care conțineau antigene formolate ale mai multor virusuri respiratorii. În ciuda unei seroconversii bune, protecția la boală nu a fost evidentă. Demonstrarea rolului anticorpilor secretați local în tractul respirator în protecție a impus reconsiderarea administrării parenterale a vaccinurilor. Există preocupări pentru dezvoltarea unor tulpini atenuate — o mutantă *ts* de virus paragripal 1 a dat rezultate promițătoare. Pe de altă parte, se testează imunogenitatea unor vaccinuri inactivate administrate intranazal. O experiență valoroasă în acest sens — cu vaccinuri gripale — există în Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau".

Vaccinul inactivat cu RSV ca și vaccinul rujeolic inactivat induc o stare de reactivitate modificată la primitori, tradusă prin infecții severe (bronșiolite, pneumonii) la contactul cu virusul sălbatic. Asemenea reacții au fost atribuite acțiunii selective a formolului asupra unor glicoproteine virale. Ca urmare, atenția a fost concentrată spre obținerea unor tulpini atenuate. Variante „reci" (adaptate la temperaturi suboptimale) sau mutante *ts* nu au putut fi acceptate din cauza virulenței reziduale. Este puțin probabil ca un vaccin viu să imunizeze copii încă din prima lună de viață datorită anticorpilor materni. Principala problemă nerezolvată în legătură cu RSV este mecanismul prin care se produce virulența excesivă la sugari, formele clinice severe apărînd în primele 3 luni de viață (Kapikian, 1969 ; Wright, 1970).

11.8.8. VACCINUL RABIC

Rabia este, în ordine cronologică, cea de-a doua viroză pentru care a fost preparat un vaccin eficient (Pasteur, 1885). Datorită particularităților epidemiologice, rabia are o distribuție largă și nu sînt perspective de limitare a extinderii acestui virus. Vaccinurile clasice, vii sau inactivate, sînt preparate pe țesut nervos (Fermi, Semple) sau embrion de pasăre (Koprowski, Powell și Colberson). Ele nu au decît o activitate slabă și inegală și sînt administrate într-un număr excesiv de doze numai subiecților expuși. În suspensie crudă, creierul unui animal rabigen sau embrionul de găină inoculat cu tulpina Flury conțin un raport dezavantajos al antigenului viral față de cel neviral (10^{-9}). De aici complicațiile care survin consecutiv administrării unui astfel de preparat. În tabelul 11-IV sînt indicate riscurile neurologic și letal consecutive vaccinării antirabice în trei preparate curent utilizate.

TABELUL 11-IV

Unele complicații ale vaccinării antirabice

Vaccin preparat în :	Complicații neurologice	Mortalitate
Țesut nervos	1/600—1/8 000	1/35 000
Embrion de rață	1/25 000	1/225 000
Celule diploide umane	Numai reacții de hipersensibilizare întîrziată (tip I sau tip II)	

Vaccinurile inactivate preparate cu virus cultivat în celule diploide umane sau în culturi de celule neumane (fibroblaste de pasăre, celule renale de hamster etc.) sînt mult mai eficace și mai puțin reactogene.

Vaccinul preparat pe celule diploide umane (HDC) se poate administra intramuscular (1 mL *per* doză) sau intradermic (0,1 mL *per* doză). Anticorpii induși după inocularea intradermică nu au un titru mai slab sau o durată mai mică de persistență. În cazul în care potența vaccinului a fost satisfăcătoare, diferențele semnalate mai sus pot fi atribuite și următoarelor cauze : efectul imunosupresor al inoculărilor multiple ; degradarea vaccinului în cursul stocării (deficiențe în „lanțul frigului“) ; administrarea subcutanată și nu intradermică ; efectul imunosupresor al unor medicamente luate concomitent (de exemplu, chimioterapia antipaludică). Toate aceste elemente pot fi reținute în legătură cu aplicarea altor vaccinuri virale.

Schemele sugerate pentru administrarea profilactică sau terapeutică a vaccinului rabic sînt redate în capitolul *Rhabdoviridae*. Experiența a 5 ani de utilizare a vaccinului antirabic preparat în HDC (peste jumătate milion de doze administrate) a demonstrat imunogenitatea superioară a acestui preparat și reactogenitatea moderată. Se consideră că titrul minim protector al anticorpilor antirabici este 1/16 (aproximativ 0,16 UI/mL).

Controlul serologic este recomandat pentru urmărirea rezultatelor imunizării. Reacțiile consecutive vaccinării sînt mai ales de tip alergic și au o frecvență de 11 la 10 000 de persoane vaccinate. Mai frecvente ($9^0/_{000}$) sînt reacțiile mediate prin complexe imune : erupții pruriginoase, urticarie, dureri articulare, febră, fenomene astmatiforme. Datele existente pînă în prezent arată că reacțiile adverse sînt mai frecvente la rapeluri și mai ales la cei ce au mai avut astfel de manifestări (asociate sau nu vaccinării). Imunizarea acestei ultime categorii de subiecți trebuie făcută numai cu indicații exprese și sub supraveghere medicală apropriată.

În vaccinul rabic inactivat, antigenul protector esențial este glicoproteina de suprafață G. Dozarea acesteia poate contribui la standardizarea vaccinului. Pe de altă parte, s-au sintetizat un număr de polipeptide reprezentînd secvențe de aminoacizi ale unor structuri virale. Pînă în prezent, încercările de a induce anticorpi antipeptide virale capabili să neutralizeze virusul nu au dat rezultate.

O problemă terapeutică de interes crescînd este eficiența vaccinului rabic în cazul infecției cu virusuri înrudite cu virusul rabic care au provocat victime și la om (Duvenhage, Mokola). În perspectivă, dezvoltarea unui vaccin viu atenuat în culturi de celule, imunogen dar nonneurotrop, poate constitui soluția optimă atît pentru promptitudinea cu care se poate induce seroconversie după administrare unică, cît și pentru spectrul mai larg al răspunsului imun.

11.8.9. VACCINUL VARIOLIC

Variola prezintă astăzi un interes istoric, un exemplu de boală pestilențială eradicată printr-o campanie susținută de vaccinare coordonată la nivel mondial. La 8 mai 1980, cea de a 33-a Adunare generală OMS a certificat că întreaga populație a globului era în afara pericolului în ceea ce privește acest flagel. Trecuseră 184 de ani de cînd Edward Jenner făcuse prima vaccinare.

Conceperea și realizarea programului de eradicare s-a bazat pe următoarele date : *1)* variola se transmite exclusiv de la om la om ; *2)* nu există rezervor animal de virus ; *3)* infecția este totdeauna manifestă și nu există purtători ; *4)* perioada de incubație este relativ lungă — 2 săptămîni —, lăsînd timp pentru intervenții care să prevină cazurile secundare ; *5)* boala difuzează lent în zonele epidemice, cu mai multe generații de cazuri într-o singură familie. Programul a debutat cu o fază preparatorie vizînd personalul și resursele ce trebuiau angajate. Au urmat trei faze propriu-zise : de atac, de consolidare și de menținere, care au implicat vaccinarea largă a populației susceptibile, supravegherea epidemiologică și confirmarea zonelor eradicate.

Ultimul caz de variolă a fost înregistrat în Somalia, în octombrie 1977. Ulterior, au existat discuții privind necesitatea menținerii vaccinării variolice în imunizările de rutină sau în cele reclamate de certificatele internaționale de vaccinare. Rînd pe rînd s-a renunțat la vaccinare din mai multe motive :

— timpul a confirmat realitatea eradicării ;

— la scară mondială continuă să fie operativ un sistem de supraveghere, capabil să asigure rapid un diagnostic precis și o izolare promptă a suspecților ;

— riscul asociat vaccinării (complicații cutanate, neurologice etc.) este mai mare decît iminența bolii.

În prezent, vaccinarea antivariolică este necesară numai persoanelor din laboratoarele care lucrează cu virusul variolic sau cu virusuri animale înrudite : vaccina, variola maimuțelor etc. Ultimele două focare de variolă din Europa au provenit din laboratoarele de virusologie : în martie 1983, la Londra, au existat două cazuri secundare fatale și în august 1978, la Birmingham, a existat un caz secundar și un deces indirect relatat — sinuciderea specialistului responsabil cu măsurile de supraveghere.

Știut fiind că stocurile de virus din laboratoare pot constitui singura sursă de boală, OMS a cerut reducerea locurilor unde virusul este păstrat. În prezent, numai în două laboratoare, în Moscova și Atlanta, există virus variolic păstrat în condiții de securitate extremă.

Pentru necesități de urgență, există 300 milioane de doze-vaccin, păstrate la Geneva, New Delhi și Toronto, testate periodic pentru potență.

Se cunoaște reactogenitatea apreciabilă a vaccinului variolic și, mai ales, frecvența encefalitelor postvaccinale în cazul în care primovaccinarea se face la vîrstă adultă. Se poate aprecia că în „accidente“ epidemiologice, cînd va fi necesară vaccinarea extinsă, numărul complicațiilor va fi considerabil. Știind că imunoglobulinele specifice reprezintă un remediu probat, va trebui constituit un stoc și din asemenea preparate.

11.8.10. VACCINURILE ARBOVIRALE

Un eveniment în virusologie a fost descoperirea tulpinilor atenuate ale virusului febrei galbene și prepararea vaccinurilor vii, în anul 1930. Tulpinile 17 D (Max Theiler) și Dakar (Institutul Pasteur) se folosesc și astăzi. Febra galbenă este o enzootie transmisă permanent maimuțelor de specii de țînțari din pădurile tropicale și savanele din Africa și America de Sud. Ea poate cauza cazuri sporadice sau epidemii la populația rurală nevaccinată. În orașele riverane zonelor endemice există pericolul transmiterii bolii de către *Aedes aegypti*. În aceste zone trebuie instituite programe active de vaccinare iar imigranții sau turiștii trebuie vaccinați. O singură inoculare asigură o protecție completă iar copiii pot fi vaccinați de la vîrsta de 6—7 luni. În 1983 s-au notificat 778 de cazuri, cele mai multe în Africa (Ghana).

Vaccinuri vii atenuate au mai fost folosite în boala Denga, encefalita japoneză, encefalita de căpușe și encefalitele ecvine (Venezuela, St. Louis, Vest). De asemenea, sînt în uz și vaccinuri formolate. Utilizarea lor rămîne limitată la zonele endemice.

11.8.11. VACCINURILE HEPATITICE

După propagarea virusului hepatitei A la marmosete și apoi în culturi celulare, un vaccin viu atenuat a fost preparat în HDC. Vaccinul induce seroconversie la aproape toate persoanele vaccinate, fără alt efect advers decît o creștere tranzitorie a nivelului seric al transaminazelor. Nivelul optim de atenuare a virusului nu pare a fi încă atins. Pînă atunci se indică vaccinarea persoanelor expuse : militari, copii în colectivități, persoane care călătoresc spre zone cu salubritate deficientă.

Hepatita B este o boală mult mai severă și mai importantă pentru sănătatea publică. 10% din bolnavi rămîn purtători cronici, iar din aceștia 1 din 5 moare cu ciroză hepatică și 1 din 20, cu carcinom hepatocelular. Virusul hepatitei B nu a putut fi cultivat *in vitro*. Prima generație de vaccin utilizată consta din AgHBs purificat din plasma purtătorilor cronici, inactivat prin trei procedee succesive pentru a se certifica absența oricărui virus rezidual. Administrat în trei doze cu adjuvant (alaun), se obține protecție la peste 95% din primitori. Disponibilitățile de vaccin au fost restrînse datorită volumului redus de plasmă infectantă și procesului tehnologic pretențios. Produsul este foarte scump și există îndoieli asupra securității lui absolute.

Consecutiv studiilor lui Valenzuela și colab. privind sinteza și asamblarea AgHBs prin tehnologia ADN recombinant în culturi transformate de *Saccharomyces cerevisiae*, un imunogen satisfăcător a fost produs la Institutul Merck. Aplicarea acestui vaccin care conține ca antigen dimerul AgHBs neglicozilat (spre deosebire de vaccinul plasmatic) a întrunit aprecieri favorabile privind eficiența (McAller W. J., 1984).

În paralel au fost elaborate vaccinuri sintetice conținînd oligopeptide care corespund determinanților antigenici virali. Imunogenitatea acestora este condiționată de atașarea la un adjuvant acceptabil. Chiar în aceste condiții rămîne de verificat durata persistenței anticorpilor și valoarea lor protectoare.

11.8.12. VACCINURI ÎN GASTROENTERITE VIRALE

Numărul mare de serotipuri din grupul virusurilor Norwalk nu permite preconizarea unei imunoprofilaxii specifice în viitorul apropiat. În ceea ce privește rotavirusurile, care sînt o cauză majoră de morbiditate la sugari și copii mici, este clară necesitatea de dezvoltare a unui vaccin, ținînd cont și de posibilitățile practice. Datorită importanței anticorpilor locali, intestinali, de tip IgA, este de prevăzut că un vaccin eficient va trebui administrat oral. Totodată, vaccinarea va trebui efectuată în primele 6 luni pentru a preveni morbiditatea excesivă a copiilor sub 2 ani. Alte alternative sînt :

— imunizarea mamelor care urmează să alăpteze (colostrul și laptele conțin IgA) ;

— specularea similitudinilor antigenice dintre rotavirusurile umane și animale.

În controlul gastroenteritelor virale, rămîne de apreciat și participarea altor germeni : astro-, orbi-, calicivirusuri etc.

11.8.13. VACCINURILE HERPETICE

Producţia unor vaccinuri herpetice eficiente comportă probleme litigioase. Potenţialul oncogen al acestor virusuri impune restricţii asupra tipului de imunogen care poate fi folosit. Vaccinurile atenuate sau inactivate întregi conţin genomul viral care poate fi oncogen. Pînă la identificarea fragmentelor oncogene ale ADN viral şi producerea unor mutante lipsite de aceste fragmente, singura opţiune este utilizarea polipeptidelor virale izolate. Au fost testate preparate conţinînd glicoproteine derivate din celule de pasăre infectate cu HSV-2 — încorporate în adjuvant. Vaccinul a indus seroconversie precum şi imunitate mediată celular. În tratamentul herpesului recurent, preparatul nu a fost eficient. Probabil că imunizarea antiherpetică va trebui făcută timpuriu, în prima copilărie, cu rapeluri periodice ulterioare (M. R. Hilleman, 1984).

Pentru combaterea infecţiilor cu virusul varicella-zoster s-a preparat în HDC un vaccin viu atenuat cu tulpina japoneză OKA. Toţi copiii răspund la o singură doză de vaccin, iar protecţia indusă este de durată. Copiii imunosupresaţi (leucemici, de exemplu) suportă bine administrarea vaccinului dacă se întrerupe temporar terapia citostatică. Experimentul arată perspectiva acestui vaccin care poate preveni o boală fatală la imunosupresaţi. De asemenea, vaccinul este indicat la bătrîni şi la personalul medical susceptibil (Takahashi şi colab., 1975).

Infecţia citomegalică prezintă interes, pe de o parte, datorită afecţiunilor congenitale pe care le determină, pe de altă parte, datorită complicaţiilor induse la primitorii de grefe. Un vaccin viu, atenuat prin pasaje pe HDC, a fost testat la candidaţii seronegativi pentru operaţii de transplant, în cazul în care donatorul grefei era seropozitiv (Plotkin şi colab., 1976).

Teoretic, există posibilitatea ca toate virusurile herpetice implicate larg în patologia umană să poată fi combătute cu un vaccin unic care să înglobeze antigene produse prin tehnologia ADN recombinant. Un astfel de vaccin va trebui administrat timpuriu şi va proteja împotriva unui spectru larg de infecţii acute, congenitale sau neoplazii.

11.9. OPORTUNITATEA VACCINĂRII ÎN AFECŢIUNI MALIGNE, POSIBIL VIRALE

Succesul aplicării unui vaccin viu (cu un herpesvirus al curcanului) în prevenirea bolii Marek — un limfom malign epidemic al puilor de găină cauzat de un virus herpetic — a determinat speranţa unei realizări similare la om. Într-o serie de cancere umane există dovezi asupra implicării etiologice a herpesvirusurilor : limfomul Burkitt, carcinomul nazofaringian, cancerul de col uterin etc.

Imunizarea împotriva unor antigene-virus codificate existente pe suprafaţa celulelor transformate malign în condiţiile clinice menţionate este importantă în supravegherea imunologică care condiţionează dezvoltarea tumorilor sau metastazarea. Vaccinurile sigure împotriva antigenelor de membrană trebuie să fie lipsite de acidul nucleic viral. Există probe privind capacitatea oncogenă la animal a acidului nucleic al unui alt virus herpetic (*Herpes ateles*). Pe de altă parte, este greu să ne pronunțăm asupra securității unui vaccin herpetic viu, ținînd seama de persistență și reactivare, comune în cazul herpesvirusurilor.

Limfomul Burkitt și carcinomul nazofaringian sînt probleme importante de sănătate publică în anumite zone geografice. Ele sînt printre puținele tumori umane în care factorii genetici, virali și de mediu au o participare etiologică certă. Este de dorit ca reactivarea virală, în măsura în care contribuie la malignizare, să fie blocată. Imunizarea specifică ar fi o soluție în acest sens.

Totuși, este prematur să propunem vaccinarea în primii ani de viață împotriva infecției Epstein-Barr, de exemplu, atît timp cît efectul asupra incidenței condițiilor maligne nu poate fi sesizat decît peste cîteva decade. Singura posibilitate practică este investigarea individuală a statusului imun. Dacă prăbușirea imunității specifice și reactivarea infecției latente cu virus Epstein-Barr sînt evenimente precipitante ale dezvoltării tumorale, atunci imunizarea poate reprezenta o posibilitate reală de prevenire a cancerului.

Studiile epidemiologice au argumentat asocierea între infecția cronică cu virusul hepatitei B și dezvoltarea carcinomului primar hepatocelular. Amploarea problemei este ilustrată de existența a peste 200 milioane de purtători de HBV în lume. Disponibilitatea vaccinurilor hepatitice — atît cele clasice, cît și cele sintetice sau perparate prin inginerie genetică — permit conceperea unui program de imunizare anti-hepatită B, care s-ar putea reflecta și în incidența carcinomului hepatocelular. Reamintim că imunizarea unor copii susceptibili a determinat diminuarea cu 85% a prevalenței stării de purtător a AgHBs. Acest studiu a indicat posibilitatea prevenirii infecției la copii, adică la o vîrstă care conduce adesea la portajul cronic și, tardiv, eventual la cancer. În Asia de Sud-Est este în curs de aplicare un program de imunizare în hepatita B inițiat de OMS, care intenționează să diminueze și incidența carcinomului hepatic, endemic în regiune. Este pentru prima oară cînd s-ar proba posibilitatea profilaxiei cancerului prin vaccinare.

11.10. PROBLEME NEREZOLVATE

Următorii ani vor fi marcați de inițiative din ce în ce mai hotărîte în scopul dezvoltării de noi vaccinuri (nu numai virale), folosind posibilitățile oferite de biotehnologie. Prioritare sînt cercetările în domeniul infecțiilor respiratorii acute, gastroenteritelor virale, infecțiilor transmise sexual, febrelor hemoragice etc. În paralel va trebui reevaluată strategia pentru utilizarea optimă a vaccinurilor vechi și noi.

Sînt cunoscute succesele obținute în extinderea imunizării copiilor. În schimb, la adulți, vaccinările se practică mult mai restrîns. Se estimează că mai puțin de 30% dintre persoanele din categoriile de risc sînt anual imunizate antigripal iar numai 10% din personalul medical cu risc profesional pentru hepatita B este imunizat specific. Vor trebui folosite toate căile pentru creşterea numărului adulţilor imunizaţi. În domeniul bolilor infecţioase, aplicarea vaccinurilor argumentează mai mult decît oriunde preceptul general valabil că „a preveni este mai simplu şi mai ieftin decît a vindeca“.

Desigur că numărul vaccinărilor posibil de aplicat nu este nelimitat. Noile tehnologii (tabelul 11-V) oferă însă perspectiva selecţiei determinanţilor antigenici critici pentru imunizarea împotriva principalilor agenţi infecţioşi. Prezentarea acestor determinanţi într-o manieră imunologic eficientă, cuplarea lor pe cîteva suporturi acceptabile este o soluţie de perspectivă. Totodată, subliniem că vaccinurile hibride grefate pe virusul vaccinal au fost preparate şi că astfel de poliimunogeni asigură vaccinarea simultană în cîteva viroze diferite : hepatită B, gripă, herpes şi, bineînţeles, vaccină (Panicalli şi colab., 1983 ; Perkus şi colab., 1985). Se poate imagina că numai 5 vaccinuri combinate, fiecare cu cîte 5 epitopi, vor putea imuniza împotriva a 25 de infecţii diferite (M. R. Hilleman, 1983).

TABELUL 11-V

Metode noi de producere a imunogenilor din componenţa vaccinurilor virale

Imunogen	Specificitate antigenică	Încercări experimentale la :	
		om	animal
Produs prin bioinginerie	hepatită B, gripă, poliomeliă, rabie, herpes, SIDA	+	+
Peptide sintetice	hepatită B, gripă, febră aftoasă, SIDA	–	+
Vaccin hibrid grefat pe virusul vaccinal	hepatită B, gripă, rabie, herpes, SIDA, polivalente	–	+
Anticorpi antiidiotip	hepatită B, rabie, poliomielită	–	+

Bibliografie selectivă

BEST J. M., BANATVALA J. E., BOWEN J. M. — Brit. Med. J., 1974, 3, 221.
CAJAL N., CEPLEANU M., SORODOC I., CERNESCU C. — Proc. Symp. on Field Trials of Vaccines, Zagreb, 1973, p. 113.
CAJAL N., CERNESCU C. — Rev. Roum. Méd., Virol., 1984, 35, 259.
CERNESCU C., SĂRĂŢEANU D. — Vaccinuri virale, Edit. Medicală, Bucureşti, 1972.
CERNESCU C., SORODOC I., CAJAL N. — Rujeola, etiopatogenie şi profilaxie, Edit. Academiei R.S.R., Bucureşti, 1978.
CERNESCU C. — Vaccinuri şi vaccinări, Edit. Ştiinţifcă şi Enciclopedică, Bucureşti, 1979.
CERNESCU C. — Vaccinuri virale sintetice. Edit. Academiei R.S.R., 1987.
EVANS A. S. — Viral Infections of Humans, Epidemology and Control, Plenum Press Inc., New York, 1983.
HILLEMAN M. R., PROVOST P. J., BUYNACH E. B., McLEAN A. A. — Dev. Biol., 1983, 54, 433.

HILLEMAN M. R. — Ann. Intern. Med., 1984, 101, 852.
KANTOCH M. — Adv. Virus Res., 1978, 22, 259.
KAPIKIAN A. Z. — Amer. J. Epidemiol., 1969, 89, 405
KRUGMAN S. J. — Pediatrics, 1977, 90, 1.
McALLER W. J. — Nature, 1984, 307, 178.
MELNICK J. L. — Bull. World Health Organ., 1978, 56, 21.
MELNICK J. L. — Comprehensive Therapy, 1980, 5, 6.
MINOR P. D. — Nature, 1983, 301, 674.
MOSS B. — În New Approaches to Vaccine Development, p. 167, Schwabe & Co Benno, Basel, 1984.
NOTTAY B. K. — Virology, 1981, 108, 405.
PANICALLI D., DAWIS S. W., WEINBERG R. L., PAOLETTI E. — Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1983, 80, 5 364.
PENTTINEN K., CANTELL K., SOMER P. — Amer. J. Epidemiol., 1968, 88, 234.
PERKUS M. E., PICCINI A., LIPINSKAS B. R., PAOLETTI E. — Science, 1985, 229, 981.
PLOTKIN S. A. — J. Infect. Dis., 1976, 134, 470.
SABIN A. B. — Science, 1956, 123, 1 151.
SALK J., SALK D. — Science, 1977, 195, 834.
SALK J. — Dev. Biol., 1980, 47, 181.
TAKAHASHI M., OKUNO Y., OTSUKA T. — Biken J., 1975, 18, 25.
TYRELL D. A. J. — Lancet, 1978, i, 196.
VALENZUELA P. — Nature, 1982, 298, 347.
WILEY D. C. — Nature, 1981, 289, 373.
WRIGHT P. F., WOODLEND W. G., CHANOCK R. M. — J. Infaet Dis., 1970, 122, 501.
WYATT R. G., JAMES W. D., BOHL E. H. — Science, 1980, 207, 189.
* * * — WHO — Ser Rapp. Techn., nr. 594 (1976) ; 658 (1981) ; 673 (1982).
* * * — WHO — Manual of Details of Tests Required on Final Vaccines Used in the WHO Expanded Programme of Imunization, Geneva, 1985.

12

Interferență — Interferon

12.1. INTERFERENȚA

Infecția multiplă sau mixtă a unei singure celule, atît *in vivo* cît și *in vitro*, este un fenomen mult mai frecvent întîlnit comparativ cu infecția cu o singură particulă virală. Celulele din organism sau cultivate *in vitro* pot fi infectate cu virusuri necitocide, astfel încît suprainfecția cu alte virusuri (infecția mixtă) este destul de obișnuită. Diseminarea infecției de la o celulă care a fost infectată *in vivo* cu o singură particulă virală implică de obicei infecția multiplă a celulelor învecinate. Efectele unei astfel de infecții multiple depind de faptul dacă același virus (celule infectate multiplu) sau virusuri diferite ori mutante (celule infectate mixt) sînt implicate. Interacțiunile care pot urma după infecția mixtă cu virusuri înrudite, în afară de recombinarea genetică și reactivare, sînt numeroase, ca de altfel și în cazul celulelor infectate mixt. Infecția multiplă, simultană, cu cîteva particule virale ale aceluiași virus poate scurta perioada de latență și reduce asincronismul de replicare a virusului, fapt important în studiile de biologie moleculară. Din cauza eficienței mici de a produce plaje a virusurilor patogene pentru animale, majoritatea particulelor în astfel de infecții mixte sînt neinfectante și pot reduce cantitatea de virus infectant, fie prin interferență, fie prin producere de virus incomplet. Infecția aceleiași celule cu virusuri înrudite sau neînrudite poate fi urmată de replicarea lor independentă, de interferență cu multiplicarea unuia sau ambelor virusuri, de stimulare (complementare) a multiplicării virusului, amestec fenotipic sau genotipic.

Infecția multiplă sau mixtă a unei singure celule, *in vivo* sau *in vitro*, care duce la inhibarea multiplicării unui virus este cunoscută sub denumirea de interferență și a fost semnalată cu mult timp în urmă de numeroși autori (Magrassi, 1935 ; Hoskins, 1935 ; Andrews, 1942 ; Henle, 1945). După mecanismul care stă la baza acestui fenomen s-au descris trei tipuri de interferență virală : interferența mediată de interferon — denumită și interferență extrinsecă —, interferența homotipică mediată de particule defective și interferența intrinsecă (Marcus, 1977).

Acțiunea competitivă între două virusuri, dintre care unul (agentul interferent) conferă în scurt timp celulei-gazdă proprietatea de a exclude un al doilea virus (virusul interferit sau respins), a fost denumită fenomen de interferență și mai recent **interferență extrinsecă.** Deși fenomenul a fost semnalat încă din anul 1920 și cu toate că scopul unui număr mare de experiențe a fost dorința de a găsi o explicație a mecanismului interferenței, acesta a fost descoperit abia în anul 1957, cînd Isaacs și Lindenman au demonstrat că particula interferentă nu determină direct modificări în celula-gazdă, ci prin intermediul unui factor difuzabil în mediu și care a fost numit interferon. Interferonul era produs prin interacțiunea virusului gripal inactivat, termic sau prin raze ultraviolete, asupra membranelor corioalantoidiene și prezența lui putea fi pusă în evidență prin proprietatea sa de a induce interferență în fragmente proaspete de membrană corioalantoidiană. La aproape 30 de ani după descoperirea lui, interferonul nu mai este doar mediatorul fenomenului de interferență, așa cum a fost descris inițial, ci o proteină celulară purtătoare de mesaje multiple între celule, dintre care multe sînt cunoscute, altele așteaptă să fie descoperite.

Din cauza naturii ubicuitare a sistemului interferon, este important să se diferențieze contribuția lui în termeni de acțiune, de tipuri de interferență în care mecanismele sînt altele decît producerea de interferon. Există cel puțin patru mecanisme prin care un virus poate inhiba creșterea altuia : *1*) competiția pentru receptorii celulari sau distrugerea acestor receptori, astfel încît al doilea virus nu se mai poate adsorbi pe celula-gazdă și deci produce inițierea infecției ; *2*) inhibarea penetrării unui virus deja adsorbit ; *3*) interferența datorită acțiunii asupra mecanismelor de sinteză intracelulară și *4*) interferența prin modificări la nivelul asamblării virionului (Bucknall, 1973).

Interferența homotipică este interferența mediată de particule virale defective care au proprietatea de a interfera cu replicarea virionului homolog complet. Acest tip de interferență, cunoscut anterior și sub denumirea de autointerferență, apare frecvent în rezultatul titrărilor infectivității virale sub forma fenomenului de prozonă : animalele inoculate cu concentrații mai mici de virus dau un procentaj de letalitate mai mare comparativ cu animalele inoculate cu virusul nediluat. În majoritatea sistemelor cu virus gripal se produc particule neinfectante, dar care sînt capabile de hemaglutinare (fenomenul von Magnus). Aceste particule, numite „incomplete", cresc numeric în special în cursul pasajelor cu multiplicități mari de virus. Particulele incomplete au fost denumite particule interferente defective, sau particule DI. Defectul acestor particule rezidă în genomul viral, care nu conține întreaga informație genetică pe care o are genomul complet, motiv pentru care particulele sînt considerate de unii autori mutante prin deleție. Mutantele sensibile la temperatură ale unor virusuri cu genom ARN se comportă ca particule condițional-interferente defective (Youngner, 1977). Mutante *ts* ARN inhibă multiplicarea virusului de tip sălbatic cînd sînt inoculate pe același substrat celular, atît la temperatura permisivă, cît și nepermisivă. Particulele DI și mutantele *ts* au fost implicate în modularea acțiunii letale a unor virusuri infectante în cursul infecțiilor persistente (Sekellick și Marcus, 1978).

Deși interferența homotipică nu este mediată de interferon, faptul că anumite particule DI ale virusului stomatitei veziculoase, care conțin ARN mesager și antimesager legat covalent (± ARN), sînt bune inductoare de interferon sugerează că sistemele în care interferența prin particule DI este operativă necesită condiții de reevaluare mai riguroase (Marcus, 1981).

Deoarece în cursul multiplicării multor virusuri apar particulele DI, acțiunea lor interferentă asupra virusului activ poate fi importantă în limitarea diseminării virusului în gazda infectantă.

Interferența intrinsecă a fost descoperită în cursul unei epidemii de rubeolă de către Marcus și Carver (1964), care au constatat că celulele de rinichi de maimuță infectate cu virusul rubeolic deveneau refractare la suprainfecție cu virusul maladiei Newcastle. A fost denumită interferență intrinsecă pentru a fi deosebită de interferența care se datorează unui factor extrinsec — interferonul.

Interferența intrinsecă reprezintă inducerea de către un virus heterolog a unei stări antivirale care previne suprainfecția cu NDV (virusul-prototip) sau alte virusuri neînrudite. Se deosebește de interferența mediată de interferon pentru că nu este dependentă de sinteza de ARN celular (Marcus și Carver, 1967). Necesită însă sinteză de proteine și un genom viral funcțional care codifică penru proteinele de interferență, blocînd astfel replicarea unui alt virus suprainfectant, ca NDV, virusul Sendai (Wainwright și Mims, 1967) sau VSV (Hunt și Marcus, 1974). Proteinele responsabile sînt codificate de genomul virusului inductor, deoarece interferența intrinsecă se dezvoltă normal în prezență de actinomicină D, în timp ce virusul iradiat cu raze ultraviolete nu induce interferență.

Interferența intrinsecă poate fi indusă de următoarele virusuri : virusul rubeolic (Marcus și Carver, 1965), virusul Sindbis (Marcus și Zuckerbraun, 1970), virusul West Nile (Marcus și Carver, 1967), virusul citomegalic (Seto și Carver, 1969), reovirusul (Zuckerbraun și Marcus, 1971), virusul poliomielitic (Marcus și Carver, 1967) și unele orthomyxovirusuri (Rott și colab., 1972).

Interferența intrinsecă poate fi considerată ca fenomen al unei stări antivirale numai în condiții suficient de riguroase pentru a exclude sistemul interferon, și anume : *1*) folosirea actinomicinei D ca inhibitor al sintezei ARN celular ; *2*) folosirea de celule refractare fie la inducerea sau acțiunea interferonului și *3*) folosirea de ser antiinterferon (Marcus, 1981).

Deci, interferența mediată de virusuri reprezintă un sistem complex, în care efectele antivirale sînt mediate nu numai de interferon, ci și de alte modificări induse de virusuri în celule.

12.2. INTERFERONUL

Interferonul a fost descoperit în anul 1957 de Isaacs și Lindenman, care au observat în mediile culturilor celulare infectate cu virusuri gripale inactivate prezența unei proteine care reacționează cu celulele normale făcîndu-le rezistente față de infecția cu alte virusuri.

Recunoscut inițial ca un agent antiviral, interferonul s-a dovedit ulterior a fi purtător și de alte mesaje între celulele organismului, fapt pentru care unii autori îl includ în sistemele hormonale glicoproteice. În acest sens, interferonii sînt considerați astăzi ca citokine, adică proteine purtătoare de mesaje chimice importante în reglarea funcțiilor diferitelor celule ale organismului. Deoarece citokinele sînt mediatori eliberați de celule și care influențează funcția altor celule, interferonii reprezintă un sistem de comunicare între toate celulele nucleate ale organismului.

12.2.1. SISTEMUL INTERFERON

Interferonul este o proteină celulară care nu este sintetizată decît în prezenţa unui stimul reprezentat de virus sau alţi inductori nevirali. În cursul etapelor timpurii de multiplicare a virusului, unele evenimente moleculare (probabil prezenţa acidului nucleic viral străin) derepresează o genă celulară care conţine informaţia genetică pentru proteina-interferon (fig. 12-1). Gene pentru interferonii umani se găsesc în cromozomii 2, 5 şi 9. Interferonul este sintetizat de ribozomii celulari şi o proteină reglatoare controlează sinteza lui. Noua moleculă de proteină, conţinînd şi o mică cantitate de carbohidrat este secretată activ de celulă. Această glicoproteină cu greutate moleculară între 15 000—30 000 daltoni este produsă în acelaşi timp cu virusul progen de către celula infectată. Molecule de interferon reprezintă jumătate din sistemul interferon.

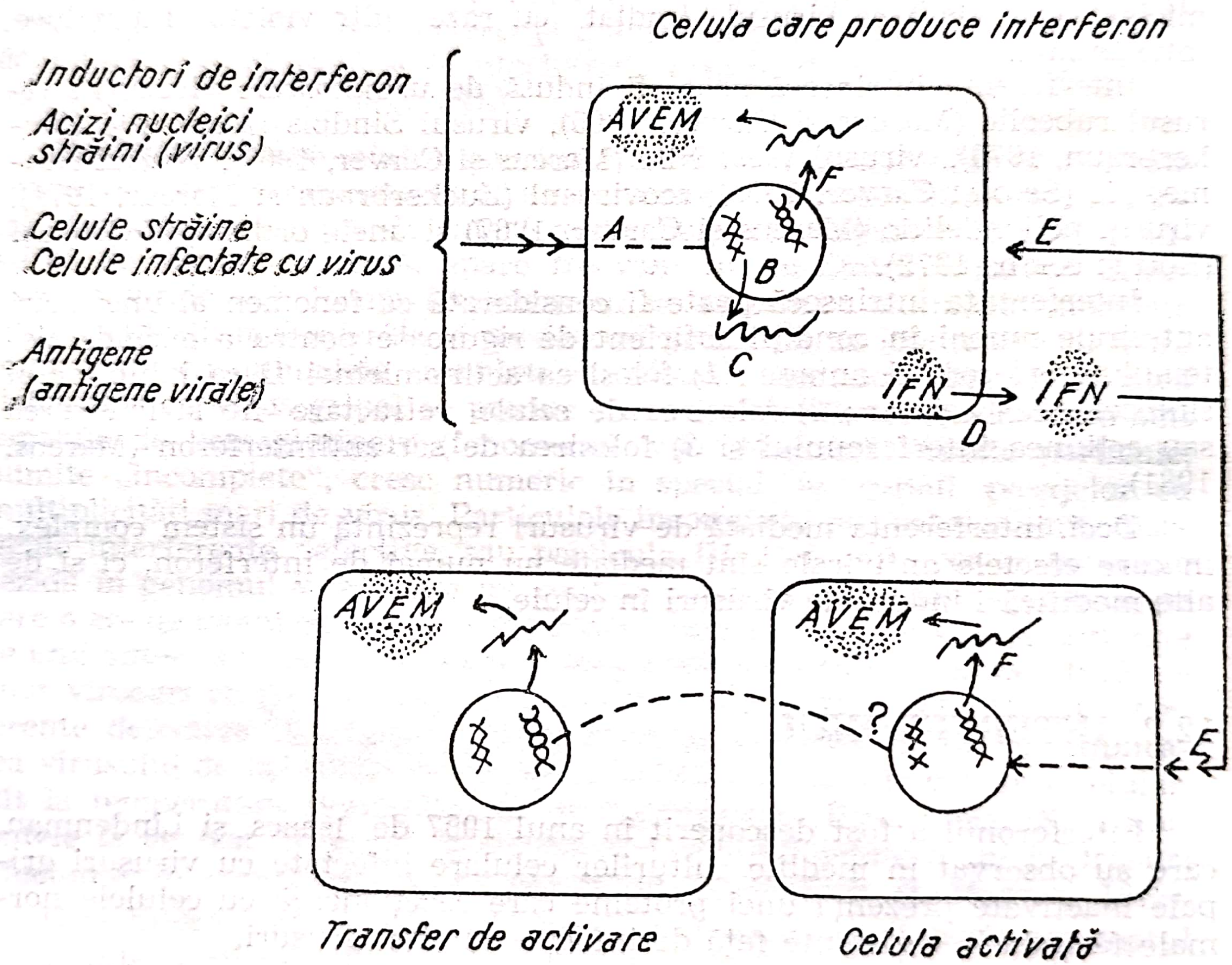

Celula care produce interferon
Inductori de interferon
Acizi nucleici străini (virus)
Celule străine
Celule infectate cu virus
Antigene (antigene virale)
AVEM
F
A
B
C
E
IFN
IFN
D
AVEM
AVEM
F
?
E
Transfer de activare
Celula activată

Fig. 12-1 — Evenimente celulare ale inducţiei, producerii şi acţiunii interferonului (IFN) (după Baron şi colab., 1982).

Inductorii de interferon reacţionează cu celula şi derepresează gena sau genele-interferon *(A)*. Acest eveniment duce la producerea de ARNm pentru IFN *(B)*. ARNm este translat în proteina-IFN *(C)* şi este secretat în lichidul extracelular *(D)* unde reacţionează cu receptori de la nivelul membranei celulare *(E)*. Celulele stimulate de interferon derepresează genele *(F)* pentru moleculele efectoare antivirale *(antiviral effector molecules*, AVEM), care sînt necesare pentru a stabili rezistenţa antivirală şi alte modificări celulare. Celulele activate stimulează de asemenea celulele vecine printr-un transfer de activare al cărui mecanism este încă necunoscut.

Interferonul secretat de celula infectată nu inactivează virusul direct, acționează însă asupra membranelor celulelor învecinate, derepresînd o a doua genă care codifică pentru moleculele efectoare antivirale. Pentru interferonul uman, gena se găsește în cromozomul 21. Prin calea clasică de sinteză a proteinelor, această a doua genă a sistemului interferon este transcrisă și translată în proteine, majoritatea cu funcții enzimatice care interferează cu sinteza de proteine sau acizi nucleici virali.

12.2.2. ACTIVITATEA ANTIVIRALĂ PRIN TRANSFER INDUSĂ DE INTERFERON

În afară de calea clasică prin care interferonul induce activitatea antivirală într-o populație de celule, starea antivirală și alte activități induse de interferon pot fi transferate la celule învecinate care nu vin în contact direct cu interferonul (Blalock și colab., 1982). Celulele efectoare tratate cu interferon și cocultivate cu celule netratate alogenice și xenogenice sînt capabile să transfere activitatea celulelor care nu sînt expuse direct, cu condiția unui contact direct între celule efectoare și „recipiente" (vezi fig. 12-1).

Deci, interferonul folosește molecule mesagere secundare pentru transferul de informație atît în interiorul celulei, cît și între celule. Acest transfer amplifică sistemul interferon și pare să fie mecanismul de răspîndire a activității antivirale, în special în țesuturile avasculare (suprafața tractului respirator, tract gastrointestinal și ochi) și în țesuturile accesibile leucocitelor mobile (inflamații locale).

12.2.3. DEFINIȚII ȘI CRITERII PENTRU ACCEPTAREA UNUI INHIBITOR VIRAL CA INTERFERON

Un grup de cercetători întruniți la un miting organizat de Centrul Național S.U.A. în domeniul interferonului (1980) au dat următoarea definiție : „Un factor pentru a fi calificat interferon trebuie să fie o proteină, care are activitatea antivirală virus-nespecifică și care este dependentă de sinteza de ARN și proteină celulară". Definiția se bazează pe criteriile de acceptare a unui inhibitor viral ca interferon propuse anterior de Lockart (1973). Aceste criterii sînt următoarele : *1*) inhibitorul viral trebuie să fie de natură proteică ; *2*) efectele antivirale să nu rezulte din efecte toxice nespecifice asupra celulelor ; *3*) să fie activ față de un număr mare de virusuri neînrudite între ele ; *4*) să inhibe multiplicarea virusului printr-un efect intracelular care implică sinteza de ARNm și proteină celulară. În plus, majoritatea interferonilor au următoarele proprietăți : *5*) se găsesc în organism sau în mediile culturilor celulare numai după introducerea stimulului corespunzător ; sînt și excepții, în rare cazuri interferonul putînd fi sintetizat „spontan" ; *6*) să fie mai activ în celulele speciei omoloage cu cele care au sintetizat interferonul și *7*) să fie stabil la pH 2. Aceste ultime două proprietăți pe care nu le au toate tipurile de interferon vor fi discutate ulterior.

12.2.4. INDUCTORI DE INTERFERON

Există o diversitate de inductori de interferon care pot fi totuși clasificați în două grupe :

1. În prima grupă intră virusurile, extracte virale și polinucleotide sintetice care stimulează producția de interferon în toate sistemele celulare *in vitro* și *in vivo* și a căror capacitate inductoare este legată de prezența de ARN dublu-catenar.

2. Grupa a doua, în care intră inductori heterogeni, ca bacterii, endotoxine bacteriene, mitogene (nespecifice și specifice), polianioni și compuși cu greutate moleculară mică ; toți inductorii din grupa a doua sînt activi numai *in vivo* sau în culturi de leucocite și produc în general cantități mai mici de interferon.

12.2.4.1. *Virusurile inductoare de interferon*

Primii inductori de interferon cunoscuți au fost virusurile, deoarece interferonul a fost descoperit de Isaacs și Lindenman în cursul unor studii de interferență virală cu virusurile gripale. Cercetări ulterioare au arătat că, practic, toate virusurile sînt capabile să inducă interferon în anumite condiții, care depind în primul rînd de combinația celulă-gazdă — virus folosită. S-au descris trei tipuri de interacțiuni virus — celulă care duc la producerea de interferon : *1)* prin contactul celulelor cu virus inactivat (căldură sau ultraviolete) sau particule defective neinfectante ; *2)* după inocularea cu virion complet a celulelor nepermisive și *3)* după inocularea celulelor permisive cu virus infectant care duce în același timp la producerea de interferon și sinteză de progen viral.

În general, virusurile ARN — cu genomul dublu sau monocatenar — sînt inductori mai eficienți de interferon comparativ cu virusurile ADN ; cei mai potenți inductori sînt considerați myxovirusurile, paramyxovirusurile și virusurile din familia *Togaviridae*. Deși nu se poate da un răspuns definitiv întrebării de ce unele virusuri produc interferon în cantități mai mici, este posibil ca potența lor slab inductoare să fie influențată de proteinele enzimatice codificate de genomul viral și care au funcția de a inhiba sinteza de macromolecule (acizi nucleici și proteine celulare).

Mecanismul prin care virusurile induc interferon poate fi împărțit în trei etape : *1)* interacțiunea virusului cu celula și producerea inductorului proximal ; *2)* activarea și transcrierea genelor-interferon și *3)* translația ARNm — interferon și secreția interferonului din celulă (Burke, 1982). Inductorul proximal, care este intermediarul între virion și celulă, este reprezentat de ARN dublu-catenar al virionului, ca de exemplu în cazul reovirusurilor (Long și Burke, 1971) sau, în cazul virusurilor cu ARN monocatenar, forma dublu-catenară de ARN sintetizată în celulă în timpul multiplicării virale (Marcus și Sekellick, 1977). Deci, în cazul virusurilor cu genom ARN monocatenar există o corelație între multiplicarea virusului și sinteza de interferon. Pentru myxovirusurile și paramyxovirusurile inactivate care induc interferon, deși considerate inițial neinfectante, s-a dovedit ulterior că ele sînt totuși capabile să sintetizeze ARN datorită reverstranscriptazei, enzimă care face parte din structura virionului ; deci și pentru aceste virusuri neinfectante capacitatea de a induce interferon este corelată cu sinteza de ARN (Sheaff și colab., 1972).

Nici un studiu experimental nu a determinat pînă acum mecanismul prin care ARN dublu-catenar induce interferonul. S-au propus trei mecanisme posibile, și anume că inducerea de interferon este datorită unei interacțiuni directe a ARN dublu-catenar cu nucleul (Stewart, 1979), că inductorii inhibă sinteza unui represor al genelor-interferon (Tan și Berthold, 1977) sau că acest represor ar fi interferonul însuși care se leagă de polinucleotide (De Maeyer Guignard, 1977). Nu există încă date experimentale pentru a afirma sau infirma aceste idei interesante.

Indiferent de mecanismul de inducere, genele-interferon — atît genele alfa, cît și beta — sînt activate și ARNm-interferon este transcris. Cercetări inițiale efectuate prin hibridarea celulelor somatice au indicat localizarea genelor interferonului uman pe cromozomul 2 și/sau 5 (Tan și colab., 1974 ; Slate și Radlle, 1979). Cercetări mai recente au indicat că cromozomul 9 conține genele alfa și beta care au fost clonate la bacterii (Owerbach și colab., 1981). ARNm-interferon este transportat în citoplasmă unde are loc translația. Nivelul de ARNm poate fi modulat cel puțin prin trei mecanisme : *1*) prin creșterea ratei de transcriere a genei (de exemplu, pretratarea celulelor cu butirat sau 5-bromodezoxiuridină) (Morser și colab., 1980 ; Shutlleworth și colab., 1984) ; *2*) prin creșterea timpului de înjumătățire a ARNm-interferon, ca de exemplu în fenomenul de superinducere (Ray și Pitha, 1984) sau *3*) prin creșterea translabilității ARNm (Garry și Waite, 1979). ARNm-interferon poate fi translat în celule heteroloage, în sisteme de translare acelulare sau prin injectare în oocite de *Xenopus* (Steward, 1979).

12.2.4.2. *Acizii nucleici inductori de interferon*

Ipoteza că ARN este stimulul inductor de interferon a fost propusă de Isaacs (1961) dar, ulterior, abandonată din lipsă de evidență experimentală. Ideea a fost preluată de o serie de cercetători care au dovedit că ARN dublu-catenari proveniți din surse foarte diferite sînt inductori de interferon atît *in vitro*, cît și *in vivo* (Lampson și colab., 1967 ; Field și colab., 1967 ; Tyttel și colab., 1967). Dintre poliribonucleotidele examinate, cea mai activă a fost perechea de homopolimeri poliI — poliC (poliriboinozinic — poliribocitidilic). Se cunosc date interesante despre relația dintre structura polinucleotidelor și funcția lor de inductori de interferon (De Clercq, 1977). Astfel, pentru a induce interferon, polinucleotidele trebuie să aibă o anumită greutate moleculară, mai mare decît 10 000 daltoni, să fie dublu-catenare — nu este necesar pe toată lungimea lor —, stabile la denaturare termică și la hidroliza prin nucleaze, să prezinte de asemenea o conformație sferică particulară, care este asigurată de prezența grupărilor 2′-hidroxil în partea ribozică și perechi de baze purine-pirimidine în interiorul dublu-helixului.

Polinucleotidele au și alte activități biologice, ca de exemplu activitatea anticomplementară și inhibiția reverstranscriptazei, care nu sînt condiționate de sinteza de interferon.

PoliI : C este un bun inductor de interferon și agent antiviral la rozătoare, dar produce cantități minime de interferon la om, la care s-a dovedit nefolositor din punct de vedere terapeutic (Robinson și colab., 1976). Deoarece rezultatele slabe obținute la om și negative la maimuță au fost atribuite hidrolazelor serice, s-au încercat modificări ale structurii polinucleotidelor prin complexare cu alte substanțe, ca de exemplu polilizina și carboximetilceluloza. S-au obținut derivați mai solubili și mult mai rezistenți la hidroliză, care au fost selectați pentru testare în unele viroze (Monto Ho, 1982).

Alți polimeri sintetici cu activitate de inducere de interferon sînt: piran-copolimerii, acidul poliacrilic, acidul polimetacrilic și acizii carboxilici poliacetilați. Toți acești inductori de inteferon au o structură macromoleculară cu o secvență regulată și densă de încărcături negative pe un schelet lung și stabil. Ca și poliI : C, acești inductori sintetici au și alte activități biologice : inițiază fagocitoza, activează macrofagele și stimulează imunitatea umorală și celulară.

12.2.4.3. *Inductori de interferon cu greutate moleculară mică*

Au fost descriși mulți componenți sintetici capabili de a induce interferon la animale (Grossberger, 1977). Deși acești compuși sînt aromatici și cu o structură în cicluri, nu există nici un alt component structural comun în acești compuși. Efectele antivirale ale acestor inductori *in vivo* variază nu numai în funcție de producerea de interferon, dar și de acțiunea lor asupra sistemului imun. În această categorie intră acridanonele (compuși asemănători acridinei), pirimidinonele, antrachinonele, fluorenonele (cel mai cunoscut — tiloronul) și alchildiaminele. Levamisolul, un drog antihelmintic, spre deosebire de ceilalți inductori ai sintezei de interferon clasic — de tip alfa sau beta — induce la șoarece numai interferon de tip gamma (denumirea nouă folosită pentru interferonul imun de către Tyring și colab., 1980).

Deoarece potențialul inductor de interferon al acestor compuși sintetici nu corelează întotdeauna cu activitățile lor antivirală și antitumorală, nu se poate afirma că activitățile lor biologice se produc întotdeauna printr-un mecanism interferon.

12.2.4.4. *Microorganisme nevirale inductoare de interferon*

Endotoxinele bacteriilor gramnegative induc interferon *in vitro* și *in vivo* numai în culturi de celule reticuloendoteliale, ca de exemplu macrofagele peritoneale (Smith și Wayner, 1967), celulele splenice (Koboyoshi și colab., 1969) și leucocitele (Kino, 1967). Deși primele cercetări au indicat că inițial, în inducerea de interferon, componentul endotoxinei este lipidul (Youngner și Chen, 1969), situații ulterioare nu au mai confirmat aceste date (Nagano, 1978).

Interferonul indus de endotoxină diferă de cel indus de virusuri prin timpul mai scurt de apariție în ser după inducere, greutate moleculară mai mare și lipsă de sensibilitate față de acțiunea inhibitorilor sintezei de proteină și ARN.

La animalele splenectomizate, endotoxina nu induce interferon cîteva zile, această stare refractară începe să dispară după 2 săptămîni și, la 6 săptămîni după splenectomie, cantitatea de interferon produsă este similară cu cea de la martori (Ito și colab., 1971), ficatul și plămînii în special compensînd activitatea splinei (Maehara și colab., 1972). Pe baza acestor rezultate s-a presupus că splina stimulează reticulocitele să inducă interferon în toate celulele țesutului limfoid. În acest sens, activarea artificială a sistemului reticuloendotelial la șoarece nu duce la creșterea producerii de interferon, în timp ce stimularea acestei activități la șoarecii splenectomizați duce la accentuarea sintezei acestui inhibitor.

Foarte puține bacterii grampozitive induc interferon. Însă extractele obținute din unele tulpini de *Bacillus subtilis* prin aceeași metodă cu cea folosită pentru extracția endotoxinei din bacteriile gramnegative induc formare de interferon la șoarece (Nozaki și colab., 1976). Celulele întregi de BCG nu induc interferon la șoarece, fracțiuni din peretele celular sînt însă inductoare de interferon (Nagano și colab., 1971).

Bacteriile. Unele bacterii — pneumococi, *Haemophilus,* streptococi beta-hemolitici și stafilococi — induc interferon *in vitro* la șoarece și pe culturi de celule limfoide umane.

Protozoarele. Informația existentă pînă în prezent, foarte limitată, indică cîteva protozoare care induc interferon în timpul infecției : hematozoarul palustru (Huang, 1977), toxoplasmele (Remington și Merigan, 1968) și tripanosomele (Schmunis, 1977).

12.2.4.5. *Antigene și mitogene inductoare de interferon*

O substanță asemănătoare interferonului indus de virusuri a fost prima oară descrisă în supernatantele de culturi de leucocite umane stimulate cu fitohemaglutinină (Wheelock, 1965). Interferonul produs în astfel de culturi ca răspuns față de activarea indusă de mitogen are multe proprietăți comune — fizice, chimice și biologice — cu interferonul produs *in vitro* pe leucocitele umane stimulate de virus. Diferențe între cele două tipuri de interferon au fost observate din punct de vedere al stabilității la pH 2 și 10 și la căldură (56° și 70°C, timp de o oră), interferonul indus de mitogene fiind mai labil comparativ cu interferonul clasic, indus de virus. Ulterior, acest tip de interferon produs în culturi de leucocite în asociere cu proliferarea limfocitelor stimulate de mitogene sau produs de limfocitele sensibilizate ca răspuns față de antigenele virale sau bacteriene a fost cunoscut sub denumirea de interferon de tip II sau interferon imun și, după noua clasificare, interferon de tip gamma.

Interferonul stimulat de mitogene in vitro. Leucocitele umane sau murine induc interferon dacă sînt stimulate cu concanavalină A (Johnson și colab., 1977), streptolizină O (Friedman și Cooper, 1967) și enterotoxină stafilococică (Johnson și colab., 1977). Prin folosirea tehnicilor de separare a leucocitelor în scopul obținerii de preparate pure de limfocite, s-a demonstrat că celulele producătoare de interferon de tip gamma sînt limfocitele și că prezența macrofagelor crește sinteza de interferon (Epstein, 1976). Cantitatea maximă de interferon apare la trei zile după stimularea cu mitogen a culturilor limfocit — macrofag. Proprietățile fizice și chimice ale interferonului prezent în culturile de limfocite — macrofage erau identice cu cele semnalate inițial de Wheeloch pentru interferonul produs în culturile leucocitare stimulate de mitogen. Interferonul era sensibil la tripsină, rezistent la acțiunile DNazei și RNazei și nesedimentabil după centrifugare la 100 000 *g*, pentru o oră. O mare parte din activitatea sa biologică se pierde după expunere timp de 18 ore, la pH 2, și expunere la 56°C, timp de o oră. Deși toate culturile care produceau interferon prezentau un răspuns proliferativ față de fitohemaglutinină, nu s-a observat o corelație directă între gradul de interferon sintetizat și gradul de transformare a limfocitelor (Epstein și Sugyamo, 1977).

Studii efectuate cu populații limfocitare purificate au indicat că atît limfocitele B, cît și cele T pot sintetiza interferon de tip gamma, după stimularea cu mitogene și în prezență de macrofage (Epstein și colab., 1974). Interferonul de tip gamma a fost pus în evidență în culturile de măduvă osoasă provenite de la bolnavi cu mielom multiplu (Epstein și Salmon, 1974). Astfel de culturi conțin un număr mare de celule plasmatice care reprezintă stadiul final de diferențiere a limfocitelor B. Natura stimulului pentru producerea interferonului de către aceste celule maligne nu este cunoscută. Limfocitele B umane normale sau progenitori ai celulelor plasmatice nu induc interferon dacă nu sînt stimulate cu mitogene ; un alt agent care are efecte analoage mitogenelor în ce privește producerea de interferon de către limfocitele T umane este reprezentat de preparatele imunoadjuvantului *Corynebacterium parvum* (Epstein și Sugiyama, 1977).

În afara limfocitelor umane din sîngele periferic și alte limfocite umane pot produce interferon de tip gamma dacă sînt stimulate cu mitogene, de exemplu limfocitele din amigdale (Klimpel și colab., 1975) și limfocitele din cordonul ombilical (Hahn și Levin, 1977).

Cercetări făcute la șoarece au demonstrat că limfocitele T produc interferon gamma dacă sînt stimulate cu fitohemaglutinină, concanavalină A și PPD, iar celulele B produc interferon numai după stimulare cu mitogene *„pokeweed“* (Stobo și colab., 1974). În sistemul murin, mitogenele dependente de limfocitele T sau B stimulează două tipuri diferite de interferon. Astfel s-a constatat, prin studii de cromatografie cu afinitate, că stimularea cu mitogene a celulelor B produce interferon de tip clasic, în timp ce stimularea limfocitelor T produce interferon de tip gamma.

Interferonul indus de antigene in vitro. Culturile de leucocite provenite de la indivizi cu intradermoreacții pozitive față de derivatul proteic purificat (PPD) sau imunizați recent cu anatoxină tetanică sau difterică răspund față de antigenele respective cu proliferare de limfocite și producere de interferon imun (Green și colab., 1969). Rezultate asemănătoare au fost obținute cu celule peritoneale de șoarece sensibilizate față de tuberculină și stimulate *in vitro* cu PPD în prezență de macrofage provenite de la animale imunizate sau neimunizate (Milstone și Waksman, 1970). Și antigenele virale pot induce interferon de tip gamma cînd sînt puse în contact cu limfocite sensibilizate și în prezență de macrofage (Merigan și colab., 1973). Astfel, limfocitele provenite de la donatori vaccinați cu virusul vaccinal și reimunizați cu 4—7 săptămîni înainte de prelucrarea lor răspund cu sinteză de interferon dacă sînt induse cu un antigen viral inactivat prin căldură.

Preparate de virus herpetic ca și complexe antigen-anticorp pot stimula limfocitele imune să prolifereze și să producă interferon (Fujibayashi și colab., 1975). Importanță deosebită privind tipul de interferon indus are acea celulă care în cultură este accesorie pentru limfocite. Tipul gamma de interferon este produs numai în cazul cînd sistemul de cultură conține antigen, limfocite autohtone și un monostrat de macrofage bine diferențiate. Interferonul produs prin inducerea de către antigen în culturile de limfocite — monocite obținute cu ajutorul gradientului — Ficoll — este de tip clasic și sinteza lui nu este legată de starea imună a donatorului.

Dependența limfocitelor de macrofage în sinteza interferonului imun nu este o cerință unică pentru interferon, situații similare au fost descrise și pentru alți mediatori ai imunității celulare.

Inducerea de inteferon imun in vitro. Cantități mici de interferon au fost puse în evidență pe serul șoarecelui la cîteva zile după injecția intravenoasă de fitohemaglutinină (Epstein și Merigan, 1968), de asemenea după tuberculina injectată la șoarecii sensibilizați.

12.2.5. PRODUCEREA ȘI PROPRIETĂȚILE FIZICO-CHIMICE ALE INTERFERONILOR DE TIP UMAN

Conform unei noi nomenclaturi propusă în anul 1980 de către un grup de experți în acest domeniu, fiecare interferon trebuie să fie identificat după originea lui (Hu IFN = interferon uman ; Mu IFN = interferon murin ; Boo IFN = interferon bovin ; Bat IFN = interferon de șobolan etc.) și, pe baza specificităților antigenice, s-a făcut o clasificare a Hu IFN și Mu IFN în trei tipuri distincte : alfa, beta și gamma. Hu IFN alfa era cunoscut anterior sub denumirea de interferon leucocitar și limfoblastoid, sau interferon de tip I, stabil la pH 2 ; Hu IFN beta — sub denumirea de interferon fibroblastic, sau de tip I, stabil la pH 2, iar Hu IFN gamma — sub denumirea de interferon imun, de tip II, labil la pH 2.

12.2.5.1. *Hu IFN alfa Le (interferonul leucocitar)*

Primul cercetător care a demonstrat că leucocitele umane pot fi folosite ca substrat celular pentru inducerea de interferon a fost Gresser (1961). Doi ani mai tîrziu, Cantell și colab., în Finlanda, încep investigații sistematice pentru prepararea interferonului leucocitar în cantități mari necesare aplicării lui clinice și studiilor structurale. Celulele sînt obținute din sedimentul leucocitar provenit din sîngele donatorilor și sînt induse cu un paramyxovirus — virusul Sendai. În condiții de preparare (control automatic de pH și temperatură) dintr-un volum de 400 mL de sînge se obțin circa 1—2 milioane unități interferon (Cantell și Hirvonen, 1978). Pentru a fi aplicat în clinică, acest interferon este concentrat prin precipitare cu tiocianat de potasiu și purificat parțial prin extracție etanolică și modificări de pH.

Cu ajutorul tehnicilor de fracționare a proteinelor, prin cromatografie de afinitate (cu anticorpi monoclonali, lectine sau alți mici liganzi) interferonul leucocitar a fost obținut în stare pură, necesară studiilor chimice (Knight, 1978).

Analiza secvențelor de aminoacizi ai peptidelor interferonului purificat (Berg și Heron, 1980), precum și cercetările efectuate asupra interferonului leucocitar obținut prin tehnica ADN recombinant la bacterii

(Goeddel și colab., 1980) au demonstrat că interferonul de tip alfa conține 14 subtipuri diferite prin structura lor chimică și prin proprietăți antigenice și biologice studiate *in vitro*.

Multiplicitatea componenților interferonului de tip alfa produs pe leucocite umane este demonstrată și de heterogenitatea greutății lui moleculare determinată prin electroforeză în gel de poliacrilamidă, care separă două populații de 15 000 și 21 000 daltoni (Stewart și Desmyter, 1975).

Din punct de vedere chimic, subtipurile interferonilor alfa leucocitari sînt proteine, fiecare component fiind alcătuit din 166 de aminoacizi, cu excepția unui singur subtip care are 165. Contrar primelor afirmații, se consideră astăzi că interferonul de tip alfa nu conține carbohidrați, deci nu este glicoproteină (Fantes, 1982). După alți autori, speciile moleculare mai mari de 19 000 daltoni pot conține carbohidrat, ele reprezintă însă o fracțiune foarte mică din interferonul leucocitar uman (Rubinstein și colab., 1981).

12.2.5.2. *Hu IFN alfa Ly (interferonul limfoblastoid)*

Acest tip de interferon uman este obținut în cantități mari folosind linia celulară limfoblastoidă Namalva, derivată dintr-un limfom Burkitt (Custafinis și Finter, 1977 ; Zoon și Buckler, 1978). Aceste celule pot fi cultivate în suspensie și produc titruri acceptabile de interferon (20 000 unități/mL) cînd sînt stimulate cu paramyxovirusuri (Newcastle sau virusul Sendai).

Spre deosebire de celelalte linii limfoblastoide care conțin virusul Epstein-Barr, linia Namalva conține cîteva copii incomplete de genom viral *per* celulă (Anderson, 1975). Interferonul Namalva poate fi concentrat și purificat parțial prin precipitare cu acid tricloracetic, omogenizare în etanol și modificare treptată a pH care permite precipitarea majorității proteinelor (Fantes, 1978) ; purificarea la omogenitate s-a obținut prin cromatografie de afinitate cu anticorpi monoclonali (Fantes și Allen, 1981). Greutatea moleculară a IFN limfoblastoid este 18 500 daltoni (Zoon și colab., 1979) și, ca și interferonul alfa leucocitar, este un produs policlonal conținînd mai multe subtipuri de interferon.

12.2.5.3. *Hu IFN beta (interferonul fibroblastic)*

Este obținut pe fibroblaste umane, linia diploidă umană FS-4 sau pe o linie celulară clonală denumită C-10, derivată din fibroblaste de embrion uman transformate de SV4O — interferonul obținut pe această linie fiind cunoscut și sub denumirea de interferon fibroblastoid. Interferonul este indus cu ARN dublu-catenar poliI, poliC și superindus prin adăugarea secvențială de cicloheximidă și actinomicină D (Edy și colab., 1982). Deoarece fibroblastele nu cresc în suspensie și sînt dependente de „ancorare“ s-au imaginat diverse sisteme de cultivare care să prezinte suprafețe mari în vase sau volume mici. Conceptul de *„micro-carrier“* folosește perle din material plastic cu caracteristici fizice (dimensiune, densitate, încărcătură de suprafață) optimizate pentru cultivarea celulelor și care pot fi suspendate prin agitare în vase cu mediu de cultură, combinînd astfel suprafaţa necesară pe care pot cultiva celulele cu avantajul culturii în suspensie (Van Wezel, 1967). Folosind astfel de sisteme de cultivare s-a obţinut interferon cu titru în medie de 5 750 UI/mL (Edy şi colab., 1977). Linia celulară C-10, care este trisomică pentru cromozomul 5, dă preparate cu titruri pînă la 500 000 unităţi/mL.

Purificarea interferonului fibroblastic a fost făcută prin cromatografie pe medii bazate pe interacţiuni hidrofobe (sepharoză 4B etc.) sau pe alte medii, deoarece interferonul beta, spre deosebire de interferonul leucocitar, se leagă de o varietate mare de matrice cu afinitate (Knight, 1977 ; Berthold şi colab., 1978). Analizat, după purificare, prin electroforeză în gel de poliacrilamidă, prezintă o greutate moleculară de 20 000 daltoni.

Din punct de vedere chimic, interferonul de tip beta este o glicoproteină a cărei compoziţie în aminoacizi este cunoscută şi, de asemenea, secvenţa celor 21 de aminoacizi N-terminali (Kenny şi colab., 1981). Galactozamina şi/sau monozamina fac parte din moleculă iar legăturile disulfidice şi un reziduu de tirozină intact sînt esenţiale pentru activitatea lui.

În ce priveşte heterogenitatea interferonului uman de tip beta s-a crezut iniţial că este o singură specie, dar cercetări mai recente, bazate pe existenţa a două specii de ARNm diferite ca dimensiune, indică faptul că sînt cel puţin două gene diferite care codifică pentru acest tip de interferon (Goeddel şi colab., 1981). Rezultate similare au fost obţinute şi prin studiul unor preparate sintetizate în *E. coli*, care prezintă greutăţi moleculare diferite (20 000 şi 23 000 daltoni) şi secvenţe diferite de aminoacizi N-terminale (Weissenbach şi colab., 1980).

12.2.5.4. *Hu IFN gamma*

Din cauza importanţei potenţiale a acestui tip de interferon în tratamentul virozelor şi maladiilor neoplazice, s-au studiat diferite metode de producere şi purificare. Inductorii de interferon gamma pot fi clasificaţi în cîteva categorii, fiind reprezentaţi de o varietate de antigene, substanţe mitogene, anticorpi faţă de limfocite, enzime şi reacţii limfocitare mixte. Cei mai folosiţi inductori sînt fitohemaglutinina, concanavalina A, enterotoxina stafilococică A (Falcoff şi colab., 1972 ; Langford şi colab., 1978) şi interleukina de tip 2 (Stauton, 1985). A fost numai parţial purificat şi este heterogen ca greutate moleculară (40 000—46 000 şi 65 000—70 000 daltoni) şi încărcătură electrică (punct izoelectric 4,0—4,3 şi 4,91—5,38) şi se presupune că este cel puţin parţial glicozilat (Langford şi colab., 1979). Acţiunea solvenţilor, detergenţilor şi lipazelor sugerează că acest tip de interferon este o lipoglicoproteină (Georgiades şi colab., 1981).

12.2.5.5. *Clonarea şi expresia interferonilor umani la microorganisme (interferonul recombinant obţinut prin tehnici de inginerie genetică, Hur IFN)*

Folosirea tehnologiei ADN recombinant a făcut posibilă expresia genelor IFN la bacterii — *E. coli* [IFNr beta (Taniguchi şi colab., 1980) ; IFNr alfa (Nagata şi colab., 1980) ; IFNr gamma (Gray şi colab., 1982)].

ADN complementar obţinut prin sinteză după modelul ARNm extras din celulele producătoare de interferon a fost clonat în *E. coli* folosind ca vector o varietate de plasmide (pBR322, β-lactamaza *E. coli,* genele polimerazei fagului M52). O parte din clonele rezultate şi care prezentau o inserţie de baze noi hibridizau cu IFNr ARN şi sintetizau un polipeptid cu caracteristici biologice identice cu ale interferonilor naturali.

Studiul secvenţelor nucleotidice de ADNc — care reprezintă de fapt genele-interferon activate — a demonstrat heterogenitatea interferonului de tip alfa, prin identificarea unei populaţii de ADNc numerotate de la A la H (Goeddel şi colab., 1981), simboluri folosite şi pentru denumirea subtipurilor de IFN alfa codificate. Cunoaşterea secvenţelor nucleotidice a ADNc a făcut posibilă maparea genetică *in situ* pe cromozomi a genelor structurale IFN şi cunoaşterea secvenţelor de aminoacizi ai proteinelor-IFN.

Deşi toate subtipurile de IFN alfa sintetizate la bacterii au toate activităţile biologice care caracterizează interferonul leucocitar clasic, acestea diferă între ele prin specificitatea de celulă-ţintă. De exemplu, IFNr alfa D este de 10 ori mai activ pe celule bovine decît pe celule umane (Streuli şi colab., 1980).

Comparaţia genelor IFN alfa şi beta şi a secvenţei de aminoacizi a acestor două tipuri de interferon indică o înrudire structurală cu existenţa a trei omologii de domeniu, care determină probabil funcţii comune (adsorbţie pe receptorii celulari, funcţia antivirală şi cea antitumorală) (Weisman, 1981).

Tehnologia ADN recombinant este folosită pentru producerea, în cantităţi mari, de interferon leucocitar uman aplicabil în clinica umană. Deoarece interferonul sintetizat în bacterii nu prezintă modificările posttranslaţionale care au loc în celulele eucariote, au existat preocupări pentru sinteza lui în drojdie (Hitzeman şi colab., 1981).

12.2.5.6. *Interferoni umani hibrizi*

Izolarea de tipuri diferite de ADNc leucocitar a făut posibilă construirea de molecule hibride, folosind ca molecule parentale acei recombinanţi care au situsuri comune sensibile la acţiunea unor endonucleaze de restricţie (Streuli şi colab., 1981 ; Goeddel, 1982). De exemplu, IFNr A şi IFNr D pot fi „tăiate“ enzimatic şi religate la nivelul segmentelor complementare respective. Aceste cercetări au permis stabilirea corelaţiei dintre funcţie şi structură în cadrul moleculei de interferon şi, din punct de vedere practic, posibilitatea de a combina în laborator anumite subtipuri de interferon leucocitar care pot fi superioare celor naturale în anumite scopuri terapeutice.

12.2.6. SPECIFICITATEA DE SPECIE A INTERFERONULUI

Dacă specificitatea de specie a interferonului, adică proprietatea de a fi activ pe celule de la aceeaşi specie de animal cu aceea pe care a fost indus, era considerată în trecut ca o dogmă (Isaacs, 1957), cercetările ulterioare au dat rezultate contradictorii. Unele concluzii experimentale au scos în evidenţă capacitatea interferonilor de a da răspunsuri biologice care depășesc barierele de specie (interferonii leucocitari de tip alfa umani, porcini, bovini și ecvini) (Carter, 1979), în timp ce altele accentuează o specificitate de specie strictă (interferonul obținut pe celule de cobai este inactiv pe celulele umane, bovine, de șoarece) (Warfel și Stewart, 1980). Mai mult, activitatea interferonilor umani de tip alfa și beta depinde — în cadrul aceleiași specii — și de liniile celulare folosite (Danielescu și colab., 1963 ; Wilcek și colab., 1977). Printre factorii care influențează sensibilitatea diferitelor celule omoloage față de interferon face parte și controlul genetic. Celulele umane trisomice pentru cromozomul 21 (Tan și colab., 1973) și celulele de șoarece trisomice pentru cromozomul 16 (Cox, 1980) sînt mult mai sensibile față de interferonii alfa sau beta. Este posibil ca acești cromozomi să codifice pentru receptorul-interferon, deoarece introducerea cromozomului uman 21 în celule de șoarece le face sensibile la acțiunea interferonului uman.

Există diferențe de specificitate între interferonul obținut pe celule diferite, dar aparținînd aceleiași specii. De exemplu, interferonul leucocitar uman are o activitate antivirală în sisteme heteroloage mai mare decît interferonul uman beta de tip fibroblastic (Derynch și colab., 1980). Reactivitatea încrucișată de specie poate varia de la o specie moleculară de interferon la alta, chiar în cadrul subtipurilor de interferon alfa sintetizate în bacterii.

12.2.7. EFECTE BIOLOGICE ALE INTERFERONULUI

Interferonii au efecte biologice variate, fapt pentru care sînt considerați ca factori reglatori cu potențial multiplu. În afară de rolul pe care îl au în apărarea organismului față de virusuri, ei au implicații importante în imunologie, cancer, genetică celulară, reglarea sintezei proteinelor și diferențiere celulară. Majoritatea activităților atribuite interferonilor sînt prezentate în tabelul 12-I ; trebuie însă accentuat faptul că numai parte

TABELUL 12-I

Efecte biologice ale interferonului	Referințe
1	2
1. Activități antivirale (induce rezistența față de virusuri)	Stewart (1979)
2. Inhibiția agenților nevirali :	
— chlamydii :	Sueltenfuss și Pollard (1963)
C. psittaci	Hanna și colab. (1968)
C. trachomatis	
— protozoare :	Jahiel și colab. (1970)
Plasmodium berghei	Remington și Merigan (1968)
Toxoplasma gondii	
— rickettsii :	Kazar și colab. (1971)
R. akari	
— bacterii :	Gober și colab. (1972)
Shigella flexneri	
3. Efect *blocking* (inhibarea producerii de interferon)	Vilcek și Rada (1962)

TABELUL 12-I (continuare)

1	2
4. Efect *priming* (crește și accelerează producerea de interferon)	Isaacs și Burke (1958)
5. Inhibarea multiplicării celulare	Paucker și colab. (1962)
6. Creșterea toxicității:	
— v. vaccinal	Joklik și Merigan (1966)
— ARN dublu-catenar	Steward II și colab. (1972)
— concanavalină A	Steward II și colab. (1975)
— starvația prin arginină	Lee și Rozee (1975)
7. Scăderea sintezelor:	
a) Sinteze neinduse:	
— sinteză de proteine	Johnson și colab. (1968)
— sinteză de ADN	O'Shaughnessey și colab. (1972)
b) Sinteze induse:	
— tirozinaminotransferază	Beck și colab. (1974)
— glicerol-3-fosfatdehidrogenază	Illinger și colab. (1976)
— glutaminsintetază	Matsuno și colab. (1976)
— sinteză de ADN:	
● indusă de lectine	Lindahl Magnusson și colab. (1972)
● indusă de antigen	Thorbecke și colab. (1974)
● indusă de eritropoietină	Smith și colab. (1976)
8. Creșterea sintezelor:	
a) Produse neinduse	
— acid hialuronic	Yaron și colab. (1976)
— prostaglandine	Yaron și colab. (1977)
b) Produse induse:	
— arilhidrocarbonhidroxilază	Nebert și Friedman (1973)
— histamine	Ida și colab. (1977)
9. Modificări de suprafață:	
a) Activitate antitoxică	Yabrov (1966)
b) Crește legarea concanavalinei A	Huet și colab. (1974)
c) Crește expresia antigenelor de suprafață	Lindahl și colab. (1973)
d) Crește citotoxicitatea limfocitelor pentru celulele-țintă:	
— citotoxicitate specifică	Lindahl și colab. (1972)
— citotoxicitate nespecifică	Svet Moldovsky (1967)
e) Crește sensibilitatea celulelor-țintă față de anticorpii citotoxici	Skurkovich și colab. (1976)
f) Crește fagocitoza	Huang și colab. (1971)
g) „Activează" macrofagele	Khesin și colab. (1973)
h) Modificare reversibilă a celulelor amniotice	Gresser (1961)
10. Manifestări toxice:	
a) *In vitro*	
— asupra celulelor din măduva osoasă	Nissen și colab. (1977)
— asupra celulelor progenitoare granulocitare	Greenberg și Mosny (1977)
b) *In vivo*	
— degenerarea ficatului la șoarece	Gresser și colab. (1975)
— glomerulonefrită (la șoarece)	Gresser și colab. (1975)
— reacții febrile sistemice	Strander și colab. (1973)
11. Imunosupresie:	
a) Producere de anticorpi	
— *in vivo*	Braun și Levy (1972)
— *in vitro*	Gisler și colab. (1974)
b) Hipersensibilitate de tip întîrziat	De Maeyer și colab. (1975)
c) Reacția grefei față de gazdă	Hirsh și colab. (1973)
d) Fixare de complement	Strander și colab. (1973)
12. Activități antitumorale	Gresser (1977)

din aceste activități au fost induse cu preparate de interferon purificate la omogenitate, deci pentru unele activități există încă posibilitatea de a fi induse mai degrabă de impuritățile prezente în preparatele care conțin interferon. Dintre aceste activități biologice, mai importante sînt activitățile antivirală, anticelulară, efectele asupra sistemului imun și acțiunea antitumorală, motiv pentru care au fost și sînt intens cercetate.

12.2.7.1. *Rolul receptorilor de membrană asupra efectelor biologice ale interferonului*

Viața organismelor depinde de funcționarea normală a unor mecanisme intricate de comunicare intracelulară, prin care activitatea metabolică a numărului imens de celule este coordonată. Procesele de inducție și acțiune ale interferonului în timpul infecției virale reprezintă exemple ale unui astfel de sistem de comunicare intercelulară. Celulele organismului răspund la contactul cu un virus prin sinteza unei proteine — interferonul —, care este răspîndit la alte celule prin torentul sanguin, făcîndu-le rezistente la infecție. Deoarece celulele comunică cu mediul lor înconjurător la nivelul membranei plasmatice, o etapă importantă în cunoașterea mecanismelor moleculare ale agenților reglatori este elucidarea procesului de interacțiune cu suprafața celulară.

Datorită lipsei unei cantități suficiente de interferon purificat, studii directe de legare nu au putut fi făcute. Există însă numeroase experiențe care sugerează că interferonul acționează numai la nivelul suprafeței celulare fără să se internalizeze. Receptori de membrană specifici pentru interferon au fost postulați pe baza unor serii de experiențe : tratamentul cu tripsină al celulelor hibride șoarece-om distruge preferențial sensibilitatea pentru interferonul uman (Chany, 1976), șoareci singenici imunizați cu celule hibride șoarece-om dezvoltă anticorpi care blochează numai acțiunea antivirală față de interferonul uman (Revel și colab., 1976) ; interferonul legat covalent de perle de sepharoză își păstrează activitatea antivirală (Knight, 1974) ; celulele induse cu poliI : C ca să producă interferon nu prezintă rezistență față de infecția virală în prezența anticorpilor antiinterferon care împiedică externalizarea interferonului (Vengris și colab., 1975). S-a demonstrat de asemenea că interferonul are o afinitate specifică și puternică pentru reziduul carbohidrat al gangliozidelor membranei celulare (Besançon și Ankel, 1974). Faptul că interferonii umani și murini se leagă de gangliozide demonstrează un mecanism similar prin care probabil toți interferonii interacționează cu membrana celulară. Se știe astăzi că specificitatea de specie, acceptată înainte ca o dogmă, se bazează pe un fenomen mai mult cantitativ decît calitativ. De fapt interferonii umani protejează celulele de la alte mamifere cu potență variată (Desmyter și Stewart, 1976) și interferonii de șoarece la concentrații mari induc rezistență antivirală în celulele umane (Besançon și Ankel, 1977). Numai fenomenul de legare de gangliozide nu produce efectul antiviral, deoarece nici una din substanțele cu afinitate cunoscută pentru gangliozide (toxine și hormoni glicoproteici, ca tirotropina, gonadotropina etc.) nu induce activitate antivirală (Mullin și colab., 1976). Se consideră că un component specific al moleculei-interferon, care este independent de situsul de legare, este responsabil pentru activitatea antivirală (Besançon și

Ankel, 1977). Cercetări experimentale au demonstrat că proteine, probabil glicoproteine, localizate în membrana celulară sînt responsabile pentru inițierea efectelor biologice diferite ale interferonului (Chany și colab., 1982). Modelul sistemului receptor de interferon constă deci din gangliozidele de care interferonul se leagă nespecific și din glicoproteina care este situsul activator. Cooperarea între aceste elemente de membrană este condiționată de mobilitatea constituenților membranei și de integritatea citoscheletului. Efectele modulatoare ale interferonului asupra membranei celulare reprezintă astfel o etapă majoră în acțiunea lui reglatoare asupra diferitelor expresii fenotipice ale celulei. Această proprietate a interferonului reprezintă probabil unul din rolurile fiziologice principale.

12.2.7.2. *Activitatea antivirală*

Toate virusurile cu genom ADN sau ARN, cu înveliș sau fără înveliș, care se multiplică în citoplasmă sau în nucleu sînt sensibile la interferon. Există diferențe în gradul de sensibilitate între virusuri diferite și între variantele sau mutantele aceluiași virus. Faptul că toate virusurile, indiferent de mecanismele de replicare, sînt sensibile la acțiunea interferonului sugerează că efectul lui este pleiotropic.

Rezistența față de infecția virală indusă de interferon rezultă din inhibiția unei etape timpurii din ciclul de replicare al virusului (Ho și Armstrong, 1975). Interferonul produce o inhibiție a sintezei proteinelor timpurii, fără să modifice adsorbția, penetrarea și decapsidarea virionilor infectanți. Singura excepție este inhibiția prin interferon a replicării oncornavirusurilor, în care etapa modificată este o etapă tîrzie necesară pentru asamblarea sau eliberarea virusului (Pitha și colab., 1976). Mecanismele moleculare care stau la baza stării antivirale induse de interferon includ : inhibiția primară a transcrierii ARNm viral, modificări posttranscripționale sau degradarea ARNm viral și inhibiția translației ARNm viral.

Mecanismele moleculare ale acțiunii antivirale a interferonului sînt :

I. *Efectele interferonului asupra sintezei de ARN viral timpuriu în celulele infectate cu virusul ARN*. În cazul virusurilor ARN monocatenare care nu conțin polimerază și deci ARN viral funcționează ca mesager (picornavirusuri și togavirusuri), primele produse specifice virale sînt proteinele, între care se include și polimeraza ARN dependentă de ARN. Inhibiția sintezei acestei polimeraze ARN și a tuturor tipurilor de ARN viral în celulele tratate cu interferon și infectate cu aceste virusuri pune în evidență faptul că interferonul inhibă translația (Metz, 1976). Totuși, alte virusuri ARN (rhabdovirusuri și myxovirusuri, reovirusuri) conțin o polimerază asociată virionului care transcrie ARNm din ARN al virionului. În celulele infectate cu aceste virusuri, primul produs specific viral este transcrierea ARNm viral timpuriu după ARN al virusului parental de către polimeraza specific virală.

Astfel, ca și în cazul virusurilor ADN, sinteza proteinelor virale timpurii este dependentă de transcrierea și translația ARNm viral timpuriu. Cercetări experimentale au demonstrat că în aceste sisteme virus — celulă, interferonul inhibă transcrierea primară a ARNm viral [virusul stomatitei veziculoase (Marcus și colab., 1971) ; virusul gripal (Bean și Simpson, 1973) ; reovirusurile (Gupta și colab., 1974)].

II. *Efectul interferonului asupra sintezei ARN viral timpuriu în celulele infectate cu virusuri ADN.* Efectul interferonului asupra poxvirusurilor (în special virusul vaccinal) a fost investigat în numeroase laboratoare.

Aceste virusuri ADN au o polimerază ARN și un ciclu complex de replicare, transcrierea primară avînd loc în etapa în care ADN nu este complet decapsidat (se găsește în structura internă — „*core*") și este reglată de proteinele virale timpurii. În celulele tratate cu IFN, sinteza proteinelor virale timpurii este oprită (Metz și colab., 1975), de asemenea a doua etapă a decapsidării și replicarea ADN viral. S-a observat, de asemenea, o inhibiție dependentă de doză a sintezei ARNm viral timpuriu (Bialy și Colby, 1972).

In cazul SV40, un virus ADN oncogen, interferonul inhibă expresia tuturor funcțiilor virale timpurii, incluzînd sinteza de AgT, stimularea sintezei de ADN celular și transformarea celulară (Oxman, 1972). Transcripția primară la acest virus nu este catalizată de o enzimă virală, ci de o polimerază celulară. Cercetările experimentale au demonstrat că interferonul inhibă infecția cu SV40 prin blocarea transcripției genelor SV40 timpurii (Yamamoto și colab., 1975), producînd inducerea unui inhibitor intracelular care blochează transcripția ARNm viral prin legare de ADN viral la nivelul unor situsuri specifice (Metz și colab., 1977).

III. *Reglarea translațională indusă de interferon.* Cel puțin o parte din acțiunea interferonului se datorește inducerii unei reglări translaționale în celulele infectate cu virus, mecanism elucidat în parte prin cercetări în sisteme acelulare. Diferențele între extractele celulelor tratate sau netratate cu interferon în dirijarea translației unui ARN exogen au la bază două mecanisme, dintre care unul necesită prezență de ARN dublu-catenar (ARN ds) și ATP iar cel de-al doilea mecanism constă în modificări ale unor ARN de transfer și perturbări ale procesului de metilare a ARNm viral. Cercetările care au stat la baza elucidării primului mecanism s-au bazat pe faptul că ARN ds (virali sau sintetici) inhibă sinteza de proteine în sisteme acelulare și că adăugarea de ARN ds — un inductor de interferon — la extractele de celule tratate cu interferon crește inhibiția translațională (Kerr și colab., 1974). Aceste observații au dus la descoperirea a două enzime induse de interferon și dependente de prezența de ARN ds și ATP : 2—5 A sintetaza (Roberts și colab., 1976) și proteinkinaza (Lebleu și colab., 1976). 2—5 A sintetaza activează o endonuclează celulară care duce la degradarea ARNm (Clemens și Williams, 1978) iar proteinkinaza fosforilează subunitatea factorului de inițiere — eIF-2 —, blocînd astfel inițierea sintezei de proteină. Deoarece sinteza acestor două enzime este dependentă de prezența ARN ds, aceste specii moleculare de ARN sînt considerate ca modulatori, adică inductori și activatori ai sistemului interferon. Ele apar ca un produs intermediar în replicarea multor virusuri și, probabil, constituie semnalul prin care celula monitorizează prezența virusurilor care se replică (Sen, 1982).

Endonucleaza nu are activitate specifică, degradează ARN virali și celulari, activitatea ei fiind tranzitorie datorită activării unei enzime (2′-fosfodiesteraza) care degradează și tripletul terminal (CCA) al ARN de transfer (Schmidt, 1979).

Deci, inhibiția translației în sistemele acelulare provenite din celulele tratate cu interferon se datorește inhibiției inițierii sintezei de proteine prin fosforilarea factorului de inițiere, inhibiției elongației prin degradarea ARNm și deficienței unor ARN de transfer.

Un alt mecanism prin care interferonul inhibă expresia genelor virale este inhibarea unor procese posttranscripționale de ARNm, și anume procesul de *„capping“* (atașarea unui reziduu guanilic la extremitatea 5′) și metilarea — modificări care cresc rezistența ARNm față de unele nucleaze, crescîndu-le și eficiența de mesager (Gronner și colab., 1977) (fig. 12-2).

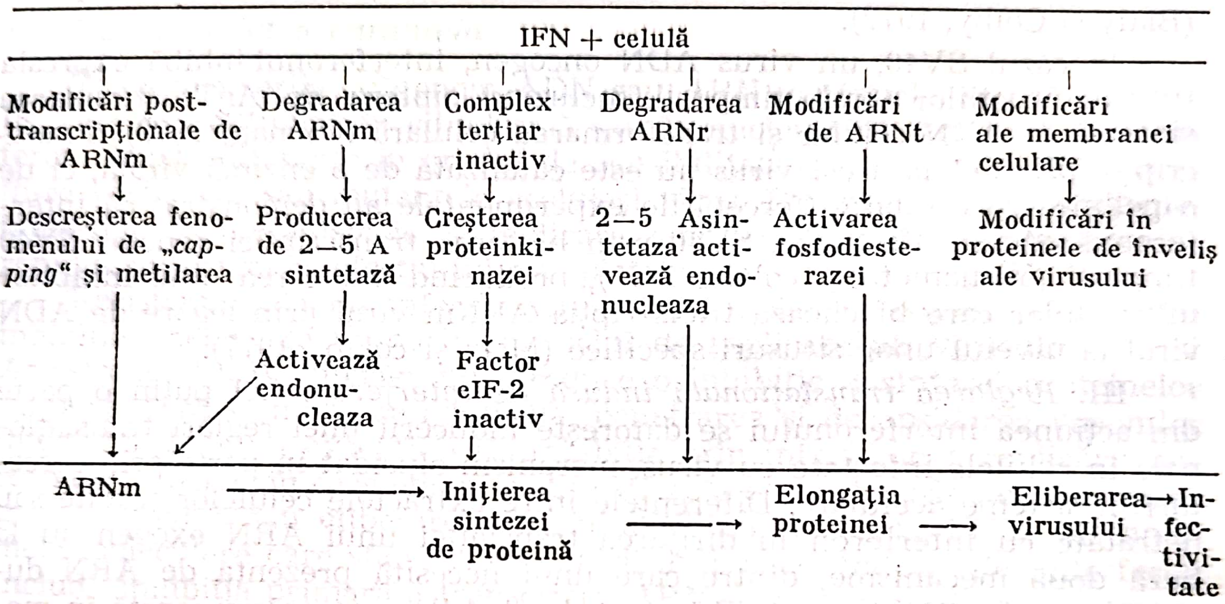

IFN + celulă
Modificări posttranscripționale de ARNm
Descreșterea fenomenului de „capping“ și metilarea
Degradarea ARNm
Producerea de 2—5 A sintetază
Activează endonucleaza
Complex terțiar inactiv
Creșterea proteinkinazei
Factor eIF-2 inactiv
Degradarea ARNr
2—5 Asintetaza activează endonucleaza
Modificări de ARNt
Activarea fosfodiesterazei
Modificări ale membranei celulare
Modificări în proteinele de înveliș ale virusului
ARNm
Inițierea sintezei de proteină
Elongația proteinei
Eliberarea virusului
Infectivitate

Fig. 12-2 — Mecanisme biochimice prin care celula activată de interferon inhibă replicarea virusurilor (după Baron și colab., 1982).

12.2.7.3. *Activitatea inhibitoare asupra multiplicării celulare*

Printre activitățile biologice „non-antivirale“ ale interferonului, activitatea anticelulară, denumită și activitate inhibitoare de creștere a celulelor *(cell growth inhibitory activity)* este cea mai bine studiată.

Interferonii sînt considerați ca primul grup de molecule bine caracterizate care inhibă reversibil proliferarea celulară. Numeroase cercetări au demonstrat că interferonii inhibă *in vivo* și *in vitro* creșterea celulelor normale, tumorale sau transformate (Gresser și colab., 1970 ; O'Shaughtressy și colab., 1972 ; Steward și colab., 1976 ; Berg și colab., 1979 ; Danielescu și colab., 1983).

Această activitate biologică a interferonului a fost descrisă prima oară de către Paucker și colab. în sistemul IFN murin — celule L (Paucker și colab., 1972). Deoarece preparatele de interferon erau nepurificate s-a presupus că efectul anticelular se datorește impurităților. Cînd preparate purificate de interferon au devenit disponibile, rezultatul a fost confirmat în sensul că interferonul, indiferent de gradul lui de purificare, are activitate anticelulară, atît în sistemul IFN murin — celule de șoarece (Ohwaki și Kowade, 1972 ; Dohl și Degré, 1976) —, cît și în sistemul IFN uman —

celule umane (Stewart și colab., 1976 ; Knight, 1976). Deși s-au constatat diferențe de sensibilitate, o strînsă corelație a fost pusă în evidență între activitățile anticelulare și antivirale în preparatele de interferon obținute în etape diferite ale procesului de purificare (filtrare în gel, precipitare, cromatografie, electroforeză etc.). Încercările de a diferenția cele două activități prin metode fizico-chimice au fost negative și efectele au fost întotdeauna specifice de specie în același grad. Aceste rezultate au demonstrat că ambele activități — antivirală și anticelulară — sînt atribuite aceleiași molecule.

Mecanisme moleculare ale activității anticelulare a interferonului. Deși s-au făcut investigații privind implicarea interferonului în evenimentele metabolice complexe care stau la baza ciclului de creștere a celulelor, mecanismele moleculare ale activității anticelulare sînt numai parțial cunoscute.

Cercetări efectuate pe linii celulare de fibroblaste clonate și stimulate ca să se dividă sincron au arătat că evenimentele care urmează stimulării mitogenice și precedă sinteza ARN pot fi clasificate în două grupe majore, și anume : evenimente timpurii, care nu sînt dependente de sinteza de noi proteine, și evenimente tîrzii, care depind de sinteza de noi proteine. Între evenimentele tîrzii s-a observat o creștere a activității unei enzime — ornitindecarboxilaza — implicată în sinteza poliaminelor cu rol în reglarea transcripției, translației și multor alte reacții celulare (Pose și Maine, 1978). Interferonul poate inhiba creșterea celulelor cînd este introdus în cultură odată cu stimulul mitogenic — cercetări efectuate în sistemul IFN murin — celule 3T3 —, prelungind în cîteva ore faza G_1 a ciclului celular și inhibînd activitatea ornitindecarboxilazei. Un alt mecanism posibil prin care interferonul inhibă multiplicarea celulară are la bază enzimele induse — 2′—5′ sintetaza și proteinkinaza — implicate nu numai în reglarea sintezei proteinelor virale, dar și celulare (M. Revel și colab., 1982). Deci, cel puțin o parte din efectele antimitogene ale interferonului au un mecanism molecular comun cu activitatea antivirală.

Deoarece interferonii inhibă creșterea celulelor atît *in vitro* cît și *in vivo*, există posibilitatea ca ei să fie implicați în reglarea creșterii celulelor organismelor multicelulare. Unii autori consideră interferonul și factorii de creștere ca două familii de hormoni cu acțiuni opuse (Inglot, 1982), clasificînd interferonul în aceeași familie cu factorii negativi de creștere.

12.2.7.4. *Rolul interferonului în modularea activității celulelor efectoare imune*

Interferonii influențează răspunsurile imune *in vitro* și *in vivo* (Lindahl, Magnusson și Gresser, 1972 ; Danielescu și colab., 1967). În multe din aceste sisteme, momentul administrării interferonului — înainte sau după antigen — și doza determină creșterea sau suprimarea reacției imune.

Modularea răspunsului imun prin interferon se concretizează prin : suprimarea sau creșterea răspunsului imun umoral, represia proliferării limfocitelor induse de antigen sau mitogene, creșterea ADCC, creșterea citotoxicității NK, activarea macrofagelor și creșterea citotoxicității specifice a limfocitelor T. Deși sînt încă puține indicații cu privire la mecanismul prin care interferonul influenţează funcţiile imune, este posibil ca rolul lui de modulator al activităţii celulelor efectoare imune să fie determinat de modificarea metabolismului anumitor molecule implicate în funcţiile imune, şi anume receptorii de antigen, antigenele de histocompatibilitate sau receptorul pentru fragmentul Fc al imunoglobulinei (Lucero, 1982).

Acţiunea interferonului asupra imunităţii umorale. Interferonul, în dozele care survin normal în organism, are un rol important în reglarea răspunsului imun umoral (Johnson şi Boron, 1976), efectele imunosupresoare fiind mai evidente decît acelea de imunopotenţare.

Răspunsul în anticorpi este inhibat atît *in vitro*, cît şi *in vivo*, cînd interferonul este introdus înainte sau concomitent cu antigenul, şi este crescut cînd administrarea lui se face într-un stadiu tardiv al experimentului (Gisler şi colab., 1974 ; Y. Sorodoc şi colab., 1973). Deoarece maturarea funcţiilor imune, inclusiv transformarea progenilor limfocitelor B în celule secretoare de anticorpi, este dependentă într-un prim stadiu de proliferarea limfocitelor, interferonul scade răspunsul imun umoral prin acţiunea directă asupra proliferării clonelor de limfocite. Interferonul fiind produs timpuriu în majoritatea infecţiilor virale, este posibil să fie responsabil pentru fenomenul cunoscut de imunosupresie umorală indusă de virus faţă de alte antigene (Virelizier, 1980).

Acţiunea interferonului asupra imunităţii mediate de celule. Cu mult timp înainte de descoperirea interferonului s-a constatat că virusurile pot modifica reacţiile imune mediate de celule faţă de antigene neînrudite. Prima observaţie îi aparţine lui Von Pirquet, care a descris anergia faţă de tuberculină după rujeolă, observaţie extinsă şi documentată şi pentru alte infecţii virale (Notkins şi colab., 1970). Evidenţa că interferonul este intermediarul prin care virusurile produc astfel de fenomene a fost obţinută în sisteme variate cu inductori de interferon sau preparate de interferon, de tipuri moleculare diferite şi grade de purificare diferită, care au dovedit că efectele asupra sistemului imun celular se datoresc aceleiaşi molecule care posedă şi activitatea antivirală. Efectul interferonului asupra imunităţii celulare *in vivo* a fost demonstrat prin prelungirea supravieţuirii alogrefelor la şoarece, efect obţinut prin tratament cu inductori de interferon (Mobraaten şi colab., 1973) sau prin administrare de preparate de interferon (Hirsh şi colab., 1974). Efectul opus, accelerarea respingerii grefelor, a fost observat după administrarea de doze mici de interferon (De Maeyer, 1981) ; un alt model experimental care demonstrează influenţa interferonului asupra imunităţii celulare este hipersensibilitatea de tip întîrziat. Interferonul are efect inhibitor atît asupra căii eferente, cît şi aferente, a acestei reacţii de hipersensibilitate. Astfel, la animalele în prealabil sensibilizate, administrarea intraperitoneală de interferon, cu cîteva ore înainte de injectarea antigenului, aboleşte complet reacţia (De Maeyer şi colab., 1976). La fel, sensibilizarea poate fi complet prevenită prin administrare de interferon cu 24 de ore înainte de imunizare (De Maeyer-Guignard, 1975).

Mecanismul prin care interferonul influenţează funcţia celulelor T este necunoscut ; ar putea fi explicat prin efectul inhibitor asupra formării limfoblastelor observat *in vitro* (Lindahl şi colab., 1972), deoarece se ştie că blastogeneza celulelor limfoide care drenează aria în contact cu antigenul reprezintă primul eveniment în sensibilizare. De asemenea, *in vivo,* unii inductori de interferon și interferonii inhibă proliferarea celulelor din măduva osoasă (Cerottini și colab., 1973). Un alt mecanism posibil care trebuie considerat se bazează pe modificările de suprafață ale limfocitelor produse de interferon — ca de exemplu creșterea expresiei antigenelor H-2 (Lindahl și colab., 1976) —, modificări care perturbează interacțiunea între diferite clase de limfocite și între limfocite și macrofage, interacțiuni importante în timpul reacțiilor imune mediate de celule.

Din rezultatele experimentale obținute pe animale reiese clar că interferonul influențează funcția limfocitelor T. Din rezultatele obținute cu celule T umane reiese că interferonul de tip gamma (imun), sintetizat de limfocitele sensibilizate specific după un nou contact cu același antigen viral, reprezintă unul din mediatorii imunității celulare față de virusuri (Gifford și Tobey, 1978). Interferonul imun este deci o limfokină produsă de limfocite ca rezultat al fenomenelor de recunoaștere imună. Pînă în prezent este singura limfokină care poate exercita control pozitiv și negativ asupra sistemului imun. Acest dublu efect al interferonului se explică, pe de o parte, prin efectul inhibitor asupra proliferării limfocitelor — fenomen important care stă la baza controlului negativ și prin activarea macrofagelor (Huang și colab., 1975) și a fagocitozei —, crescînd astfel rata prelucrării antigenului de către aceste celule, deci stimulînd reacțiile imune.

Efectul interferonului asupra citotoxicității spontane (activitate K). Inductorii de interferon și interferonii modulează atît *in vitro,* cît și *in vivo* activitatea celulelor NK (Gidlung și colab., 1978). Interferonul de tip beta natural și recombinant cît și majoritatea speciilor de tip alfa (cu excepția tipului J) cresc puternic și rapid activitatea celulelor NK umane *in vitro* (Herberman și colab., 1985). Interferonul gamma are efecte mai puțin potente asupra activității NK și necesită un timp mai îndelungat de contact pentru a influența citotoxicitatea spontană (Luciero și colab., 1981). Acest efect de stimulare produs de interferon poate fi demonstrat și determinat cantitativ prin preincubarea limfocitelor în prezența interferonului și apoi testarea activității citotoxice a acestor limfocite față de celulele-țintă care sînt incapabile să sintetizeze interferonul (Trinchieri și Santoli, 1978).

Cînd se folosesc celule-țintă capabile de a induce interferon (majoritatea liniilor celulare umane, linii transformate de virusul Epstein-Barr sau virusul sacromului Rous), interferonul endogen indus în cultură este responsabil pentru aproximativ 80—90% din citotoxicitatea spontană observată în celulele-țintă (Trinchieri și Perussia, 1984). Aspectele acțiunii interferonului uman asupra activității celulelor NK sînt cunoscute din cercetările efectuate la bolnavii tratați cu interferon de tip alfa (Einhorn și colab., 1978). O creștere a citotoxicității nespecifice a fost observată la 43 de bolnavi după un interval de 12—24 de ore după administrare de interferon (3×10^6 U IFN/zi). Totuși, la 143 de bolnavi cu o varietate de neoplazii, tratați cu interferon alfa produs prin tehnologia ADN recombinant, nu s-a produs o creștere a acestei activități și o scădere a citotoxicității spontane a fost observată la 30% din bolnavi (Maluish și colab., 1983).

Recent, s-a constatat că interferonul și inductorii de interferon determină apariția pe suprafața celulelor NK a receptorilor pentru factorul de creștere al celulelor T — IL-2 (Kuribayashi și colab., 1981).

Pentru că interferonul *in vitro* induce expresia receptorilor pentru IL-2, este posibil ca efectul său *in vivo* asupra proliferării celulelor NK să fie mediat de IL-2. Datele experimentale sugerează posibilitatea ca interferonul să acționeze *in vivo* nu numai direct, prin creșterea activității celulelor mature, dar de asemenea prin inducerea proliferării acestor celule indirect prin intermediul lui IL-2 (Biron și colab., 1983).

Interferonul stimulează activitatea celulelor NK prin cel puțin trei mecanisme : *1*) diferențierea precursorilor NK ; *2*) proliferarea celulelor mature NK și *3*) creșterea activității citotoxice (Timonen și colab., 1982).

Efectul pretratării cu interferon a celulelor-țintă este paradoxal antagonist aceluia obținut prin pretratarea celulelor efectoare. Celulele-țintă devin rezistente față de efectul citotoxic al celulelor NK și gradul de protecție depinde de doza de interferon folosită și de sensibilitatea celulelor-țintă față de interferon (Einhorn și colab., 1979 ; Welsh și colab., 1981). Fibroblastele normale sînt protejate de doze mici de interferon, în timp ce celulele infectate cu virus și majoritatea liniilor tumorale nu sînt eficient protejate, chiar de dozele mari. Toate trei tipurile de interferon uman protejează fibroblastele umane de liza mediată de celulele NK. Inducerea rezistenței celulelor-țintă prin interferon necesită cîteva ore de incubație și sinteză *de novo* de ARN și proteină. Pentru că celulele NK „se leagă“ de celulele-țintă tratate cu interferon, efectul protector al interferonului previne probabil o etapă specifică în secvența litică ; o creștere în nivelul de acid sialic la suprafața celulei a fost propusă ca bază moleculară pentru protecția mediată de IFN (Yogees-Waren și colab., 1982).

Pe baza rezultatelor experimentale *in vitro*, confirmate în parte și *in vivo*, se poate afirma că interferonul are un rol reglator asupra activității celulelor NK *in vivo*. Apariția unui stimul inductor de interferon într-un țesut (infecție virală sau creștere tumorală) produce niveluri mai mari de interferon care induc o secvență de evenimente. Celulele NK devin foarte active și sînt capabile să lizeze orice tip de celulă. Interferonul protejează celulele țesutului normal de liză dar, cum efectul protector este selectiv, celulele infectate cu virus sau cele tumorale nu sînt protejate. Deci, activitatea celulelor NK va fi concentrată asupra celulelor patologice. În consecință, interferonul dă posibilitatea sistemului NK să dobîndească două caractere necesare pentru orice mecanism de apărare eficient : inductibilitate și selectivitate (Trinchieri, 1984). Infecția virală previne inducerea rezistenței în celula-țintă, probabil prin efectul de inhibare asupra sintezei de proteină a gazdei. La majoritatea virusurilor, acest efect este foarte timpuriu în ciclu de replicare și celulele infectate cu virus pot fi lizate cu mult înainte de asamblarea particulei virale. Factorul de creștere al celulelor T — IL-2 — crește activitatea celulelor NK *in vivo* și *in vitro* (Hefeneider și colab., 1982). Deoarece există date experimentale privind inducerea de interferon gamma de către IL-2 (Pearlstein, 1983), relația între interferon și IL-2 este destul de complexă, luînd în considerare faptul că interferonul induce receptori pentru IL-2 pe suprafața celulelor NK și IL-2 induce creșterea și maturarea celulelor NK.

Acțiunea interferonului asupra ADCC. Inteferonul amplifică citotoxicitatea celulară dependentă de anticorpi, reducînd semnificativ concentrația de anticorpi necesari distrugerii celulei-țintă (Perlmann, 1982). Deoarece o fracțiune majoră a celulelor NK au receptori Fc pentru IgG și funcție efectoare ADCC, este posibil ca mici cantități de anticorpi, care sînt prezenți după debutul bolii, și interferonul indus de virus să constituie un prim sistem de apărare celular față de invazia virală (Perlmann, 1984). Problema legată de creșterea toxicității celulelor K prin interferon prezintă și o importanță teoretică, deoarece citotoxicitatea spontană și cea dependentă de anticorpi pot fi două funcții ale aceleiași celule, care depind de mecanismul de recunoaștere diferită și care activează același sau două procese litice diferite.

Acțiunea interferonului asupra expresiei antigenelor de histocompatibilitate. Interferonii amplifică expresia antigenelor MHC din clasele I și II, influențînd astfel indirect răspunsul imun antiviral (Lindahl și colab., 1976; Rodhes și colab., 1983). Influența interferonului asupra sintezei și expresiei antigenelor de histocompatibilitate se datorește unei reglări diferențiale a expresiei ARNm la nivel transcripțional și posttranscripțional (Giacomini și colab., 1985). Cercetări experimentale efectuate cu celulele tumorale de șoarece și umane au scos în evidență o asociere între rezistența celulelor-țintă indusă de interferon față de activitatea litică a celulelor NK și expresia antigenelor MHC din clasa I (Kissling și colab., 1985). Astfel, variante stabile de limfoame murine care au pierdut AgH-2 nu sînt protejate de interferon față de activitatea NK, deși își păstrează sensibilitatea față de efectele antivirale și antiproliferative ale interferonului. Această asociere, între expresia produselor MHC și fenotipul NK, scoate în evidență un alt mecanism prin care interferonii pot modula funcțiile celulelor efectoare imune.

Datorită acestor multiple activități biologice, sistemul interferon reprezintă mecanismul timpuriu de apărare al gazdei față de infecția virală. El este operativ în cîteva ore de la infecție și importanța lui este sugerată atît de numeroasele infecții virale subclinice comparativ cu cele clinice, cît și prin exacerbarea infecției virale experimentale prin injectare de anticorpi antiinterferon. Interferonul controlează infecția virală începînd cu poarta de intrare a virusului (mucoase, epitelii), prin producerea locală de interferon de tip beta (Dianzani și colab., 1975), care reacționează cu receptorii celulelor adiacente făcîndu-le mai rezistente la virus și, de asemenea, facilitează *(priming)* o nouă sinteză de interferon în celulele învecinate și distale. Dacă virusul reușește să treacă de această barieră și ajunge în sistemul limfactic sau în circuitul sanguin, leucocitele infectate cu virus produc interferon de tip alfa. Interferonul alfa poate fi produs și local, dacă leucocitele încep să migreze în această regiune. Interferonul alfa difuzează cu mai multă eficiență în traiectul sanguin decît celelalte două tipuri de interferon. Interferonul circulant poate proteja organele-țintă situate la distanță de locul infecției inițiale. Atunci cînd virusul stimulează anumite celule NK, dacă este mitogenic pentru limfocite sau este prezent mai tîrziu, cînd apar celulele T sensibilizate, se produce interferon de tip gamma. Deoarece interferonul de tip gamma potențează activitățile biologice ale celorlalte două tipuri de interferon se amplifică toate mecanismele de apărare ale gazdei (celule NK, macrofage, ADCC și activarea celulelor efectoare imune) prin creșterea expresiei antigenelor MHC din clasele I și II. Dacă virusul ajunge totuși în organul-țintă, sinteza de interferon la acest nivel este deja activată prin : *1*) interferonul circulant care a ajuns la acest nivel facilitează producerea de cantități mai mari de interferon în momentul în care în celule pătrunde virusul ; *2*) limfocitele Tc specifice, în contact cu celule-țintă infectate cu virus, induc interferon de tip gamma sau, în organele-țintă în care interferonul nu difuzează cu ușurință poate avea loc un transfer de activitate antivirală prin limfocitele care migrează. Foarte interesantă, din punct de vedere teoretic și practic, este această inducere de sistem de transfer, care constă în transmiterea activităților induse de interferon prin comunicarea celulă-celulă (Blalock și colab., 1982). Multe molecule purtătoare de mesaj, ca și interferonul, acționează cu receptori de la suprafața celulei folosind molecule mesagere secundare pentru a transmite informația de la nivelul membranei la nucleu. Hormonii polipeptidici, de exemplu, folosesc AMP ciclic ca mesager secund. Interferonul folosește și el o moleculă sau molecule mesagere pentru transfer de informație atît în interiorul celulei, cît și între celule.

12.2.7.5. *Activitatea antitumorală a interferonului*

Toate tipurile de interferon posedă activitate antitumorală, care poate fi testată *in vitro* și *in vivo* în sisteme tumorale de origine animală, activitate care a fost confirmată și din datele preliminarii obținute prin administrarea interferonului în neoplaziile umane.

Cercetările efectuate *in vitro* cu interferon murin sau uman au scos în evidență diferențe de susceptibilitate față de efectul inhibitor asupra multiplicării celulelor între diferitele tipuri de celule tumorale murine (Gresser și colab., 1970) sau umane (Einhorn și Strander, 1977 ; Dahl, 1980), investigații care implică necesitatea unui screening *in vitro* ce poate furniza informații utile privind aplicarea în clinică a interferonului.

Interferonii au efect antitumoral *in vivo* asupra unor neoplasme induse de virus, tumori induse de substanțe carcinogene, neoplasme spontane și tumori transplantabile. Virusurile leucemiilor murine, sarcomului murin, sarcomului Rous, virusul simian sînt cîteva exemple de virusuri oncogene care au fost folosite în sisteme *in vivo* pentru testarea activității antitumorale a interferonului (Chirigos, 1977, 1981). Interferonul aplicat înainte, simultan sau după inocularea virusurilor oncogene influențează evoluția bolii și crește timpul de supraviețuire. Tumorile induse la șoareci de carcinogene chimice sînt semnificativ inhibate prin administrare repetată de interferon (Salerno și colab., 1972). Interferonul are efect inhibitor nu numai asupra evoluției celulelor tumorale, cît și asupra expresiei oncornavirusului endogen.

Acțiunea antitumorală a interferonului asupra neoplasmelor spontane a fost studiată mai ales în două sisteme : leucemia limfoidă la șoarecii AKR și carcinomul mamar la șoarece (ambele maladii tumorale sînt asociate cu virusuri endogene). Interferonul reduce semnificativ incidența leucemiei (Gresser și colab., 1970—1976) și întîrzie apariția tumorilor mamare, cu condiția să fie administrat intensiv și repetat (Came și Moore, 1972). Mecanismul activității antitumorale a interferonului este complex și numai în parte elucidat. Cel puțin două mecanisme sînt implicate, și anume : acțiune directă a interferonului asupra celulelor tumorale, avînd drept rezultat inhibarea multiplicării lor și modificări ale suprafeței celulare, și acțiune directă a interferonului asupra gazdei.

Experiențe efectuate *in vitro* au demonstrat efectul de inhibare a multiplicării celulare prin creșterea perioadei intermitotice (Gresser și colab., 1970 ; Stewart și colab., 1976). Acțiunea interferonului asupra fenotipului celulelor transformate, în funcție de tipul de celulă, se manifestă fie prin reversie completă spre fenotipul normal (Gresser și colab., 1977), fie prin reversie parțială (Danielescu și colab., 1983 ; De Bronty Boye și colab., 1985). Reversia celulelor tumorale sau transformate la fenotipul normal a fost demonstrată pe criterii de morfologie celulară, proliferare și tumorigenicitate. Interferonul poate influența și expresia unor antigene de suprafață ale celulelor tumorale, influențînd astfel eliminarea lor de către celulele efectoare specifice sau nespecifice ale gazdei.

Cel de-al doilea mecanism al efectului antitumoral se datorează acțiunii directe a interferonului asupra gazdei prin efectele multiple asupra sistemului imun și asupra celulelor efectoare nespecifice, care cresc capacitatea de rejecție a tumorii. În maladiile tumorale induse de virusuri oncogene, intervine și un al treilea mecanism, și anume inhibarea multiplicării virale care este esențială pentru menținerea bolii.

12.2.8. FOLOSIREA INTERFERONULUI EXOGEN ÎN MALADIILE MALIGNE UMANE

Rezultatele cercetărilor efectuate în neoplasmele de etiologie virală și nevirală privind acțiunea antitumorală a interferonului murin și evidența că interferonii umani posedă *in vitro* activități antiproliferative și reglatoare celulare atît pentru celulele normale, cît și neoplazice au stat la baza testării clinice a interferonilor în neoplasmele umane.

Primul studiu sistematic asupra efectului tratamentului cu interferon exogen în tumorile maligne umane a fost făcut de Strander și colab. Testarea clinică a început la Spitalul Karolinska (Suedia) în anul 1971, tratamentul cu interferonul leucocitar fiind aplicat la bolnavi cu osteosarcom după tratamentul chirurgical (rejecția locală în loc de amputare). În perioada 1971—1978 au fost tratați 24 de bolnavi cu osteosarcom, rezultatele terapeutice fiind comparate cu dezvoltarea de metastaze și supraviețuirea cu un grup de control (23 de bolnavi) tratați cu metode convenționale — iradiere preoperatorie și operație. Interferonul a fost injectat intramuscular zilnic în prima lună după operație în doză de 3×10^6 U și apoi în continuare de 3 ori pe săptămînă, timp de 17 luni. După 5 ani de la tratament, în grupul tratat cu interferon 60% din bolnavi erau fără metastaze, comparativ cu 25% din grupul martor, și procentajul de supraviețuitori era de 58% comparativ cu 33%. Rezultatele obținute au fost considerate promițătoare, dar numărul cazurilor destul de mic pentru a permite o analiză statistică concluzivă. Interferonii umani (alfa, beta și recombinant) au fost aplicați și în alte maladii neoplazice (tabelul 12-II) cu răspunsuri care au variat de la semnificative (remisiune totală sau parțială a bolii) pînă la negativ.

TABELUL 12-II

Datele selective privind evaluarea activităţii antitumorale a interferonului uman la bolnavii cu neoplazii

Tumora	Tip de interferon	Doză Regim de administrare	Nr. persoane	Răspunsuri		Referinţă
				pozitive	negative	
1	2	3	4	5	6	7
Osteosarcom	alfa	3×10^6 U, i.m., zilnic, timp de 1 lună şi în continuare 3×10^6 U, de 3 ori pe săptămînă, 17 luni	24	După 5 ani IFN: — fără metastaze: 60 % — supravieţuitori: 58 %	Martori: 25 % 33 %	Strander (1975, 1978)
Maladia Hodgkin	alfa	5×10^6 U, i.m., zilnic, 1 lună şi jumătate, apoi 7×10^6 U, zilnic, pentru 5 luni şi jumătate	1	remisiune pe o perioadă de 6 luni		Blomgren şi colab. (1976)
Limfoame nehodgkiniene	beta	8×10^6 U, i.m., zilnic	1	0	1	Dunick (1979)
	alfa	$3-10 \times 10^6$ U, i.m., zilnic	3	0	3	Dunick (1979)
	alfa	10×10^6 U, i.m., zilnic, 1 lună	6	3 (remisiune pe o perioadă de 6 luni)	3	Merigan (1978)
	alfa	3×10^6 U, i.m., zilnic, 2 luni şi jumătate	11	6	5	Gutterman (1979)
Mielom multiplu	alfa	3×10^6 U, i.m., zilnic, 3 luni	4	0	4	
„	alfa	3×10^6 U, i.m., zilnic, 2 luni	10	6 (din care o singură remisiune completă)	4	Gutterman (1979)
Leucemie limfatică cronică	alfa	3×10^6 U, i.m., zilnic, 2 luni	3	1	2	Gutterman (1979)
Leucemie limfatică acută	alfa	10^6 U/kg, i.v.	2	2	0	Hill (1978)

TABELUL 12-II (continuare)

1	2	3	4	5	6	7
Carcinom sîn	alfa	$1-3\times10^6$ U, intralezional, 8 luni	6	3	3	Dunnick şi colab. (1979)
„	alfa	3×10^6 U, i.m., zilnic, 7 luni	2	1	1	Dunnick şi colab. (1979)
„	alfa	3×10^6 U, i.m., zilnic, 2 luni	12	7 (remisiuni parţiale)	5	Gutterman (1979)
„	alfa	9×10^6 U, i.m., zilnic, 8 luni	6	4 (regresia tumorii pe o perioadă de 3—4 luni)	2	Gutterman (1980)
Melanom malign	beta	5×10^6 U, intralezional, zilnic, 4—5 săptămîni	2	2 (dispariţia tumorii macroscopic şi microscopic)	0	Horoszewicz (1978)
„	alfa		28	6 (regresie totală)	22	Krowh (1981)
Meduloblastom	beta	3×10^6 U, 14 luni (postoperator)	5	2 (remisiuni complete)	3	Nagai (1981)
Glioblastom	beta	intralezional, 3 luni, rezervor tip Ommaya	1	1 (remisiune totală)	0	Nagai (1981)
Cancer ovarian	alfa		5	4	1	Einhorn (1982)
Carcinom nazofaringian	beta	4×10^6, zilnic, 3 luni	5	1	4	Niethamer (1980)
Leucemie cu celule „în arici" („*hairy cell leukemia*")	recombinant alfa A	30×10^6 U, zilnic	28	22 (din care 6 — remisiune parţială)	6	Quesada (1985)
Hairy cell leukemia	Welferon (IFN limfoblastoid preparat la Wellcome Research Laborat.)		50	50	0	Bottomley (1985)
Mielom multiplu	recombinant (alfa 2 c)	5×10^6 U pe zi	19	activitate semnificativ inferioară tratamentului cu chimioterapie		Ludwig (1985)

Concluzia care se poate trage pe baza acestor testări clinice a terapiei cancerului uman cu interferon exogen este că bolnavii cu aceeași maladie și în același stadiu al bolii reprezintă o populație foarte heterogenă cu privire la unii parametri necunoscuți încă și care influențează eficacitatea tratamentului (Krim, 1981). Cercetările clinice asupra eficacității interferonilor pînă în anul 1980 au fost făcute exclusiv cu interferonii „policlonali" produși de celulele umane. Disponibilitatea limitată, costul mare și nivelul mic de puritate al acestor preparate a fost o piedică pentru evaluarea științifică a interferonilor atît ca agenți antitumorali, cît și antivirali. Rezultatele preliminarii prezintă interes, dar nu s-a stabilit încă în studii riguros controlate dacă interferonii au o utilitate semnificativă clinică în maladiile maligne umane, indiferent de numărul de remisiuni sau de durata remisiunilor observate.

Două descoperiri au avut un impact major în acest domeniu : producerea de interferon prin tehnica ADN recombinant și producerea de anticorpi monoclonali prin tehnica hibridomului. Cele două metode au făcut posibilă producerea interferonilor umani în cantități comerciale și sub formă de preparate pure (activitate specifică 10^8 U/mg proteină). Deoarece există posibilitatea măsurării funcțiilor imune specifice și nespecifice ca și a statusului sistemului interferon al pacientului, astfel de teste efectuate înainte, în timpul și după tratament, trebuie incluse sistematic în evaluarea eficacității interferonilor.

Cercetările de laborator sînt necesare și pot fi predictive în selectarea tipurilor de tumori care pot beneficia de acest tratament. S-au descris metode simple și sensibile pentru măsurarea activității antiproliferative a interferonului, folosind încorporarea de izotopi radioactivi — (^{14}C) timidină (Hiffenhaus și colab., 1976). Linii celulare derivate din neoplasme umane variate au fost tratate pentru susceptibilitatea lor față de activitatea antiproliferativă a interferonului (Itto și Buffett, 1980). Depinzînd de nivelul de susceptibilitate al efectului antiproliferativ al interferonului, celulele tumorale maligne au fost împărțite în două grupe : linii foarte sensibile (derivate din carcinom de vezică urinară, osteosarcom, limfom Burkitt) și altele care răspund slab (carcinom de colon, melanom și rhabdomiosarcom).

Există posibilitatea de a studia *in vivo* acțiunea antitumorală a interferonilor umani, folosind șoareci nuzi care, fiind congenital atimici și deci imunodeficienți, primesc heterotransplante de tumori umane (Rygeard, 1973 ; Horoszewier și colab., 1978). Desigur că atît sistemele *in vitro*, cît și *in vivo* nu pot reproduce în totalitate răspunsul pacientului față de tratament, dacă considerăm că activitatea antitumorală a interferonului exogen se exprimă atît prin acțiune directă asupra tumorii, cît și prin modelarea sistemului de apărare al gazdei.

Cercetările clinice efectuate pînă acum au stabilit doza maximă tolerată, nu și doza optimă antitumorală. Cercetările recente au demonstrat că dozele mai mari (9×10^6 U) sînt mai eficiente decît dozele mai mici (3×10^6 U) în ce privește inducerea unor enzime (2—5 A sintetaza) și expresia proteinelor HLA-DR în monocitele periferice precum și stimularea activității NK (Meritt și colab., 1985) precursoare.

O altă problemă nerezolvată rezultă din existența tipurilor diferite de interferon uman și întrebarea logică care rezultă : care tip este mai adecvat să fie administrat. Cercetările efectuate pînă acum au demonstrat că o combinație sinergică a interferonilor alfa, beta și gamma — care se pare că se combină cu situsuri receptoare diferite — ar putea fi mai eficace atît în maladiile neoplazice, cît și în cele de etiologie virală (Merigan, 1982).

12.2.9. FOLOSIREA CLINICĂ A INTERFERONULUI ÎN INFECȚIILE DE ETIOLOGIE VIRALĂ

Interferonii sînt biomolecule care au în organism un anumit rol, deci este logic ca potențialul lor clinic să derive din funcția pe care o au în situații normale. Organismul posedă două mecanisme de apărare importante împotriva infecțiilor virale : mecanismul interferon și răspunsul imun — umoral sau celular —, mecanisme care sînt complementare unul față de altul. Interferonul este produs local de orice fel de celulă, imediat după infecția virală ; răspunsul imun este generat de celule specializate, la un loc distant de infecția virală, și necesită cîteva zile ca să devină activ. Interferonul acționează asupra celulelor și împiedică replicarea virusului în special în celulele adiacente celulei infectate ; răspunsul imun acționează asupra particulelor virale extra- și intracelulare la orice nivel din organism. Rolul esențial al interferonului constă în întîrzierea invaziei virale, permițînd răspunsului imun să aibă loc și să devină efectiv. Se știe că în unele infecții virale răspunsul imun poate deveni nociv, deci un alt rol posibil pentru interferon este acela de a limita producerea de componente virale care constituie ținta pentru atacul imun și astfel să influențeze răspunsul inflamator mediat imunologic.

În modelarea moleculei de interferon, natura a fost confruntată cu aceeași problemă ca și biochimiștii angajați în obținerea de droguri antivirale : este foarte greu să se interfereze cu replicarea virală fără să se producă daune celulei-gazdă. Faptul că interferonii nu sînt sintetizați în organism în mod continuu sugerează că au și efecte indezirabile asupra fiziologiei celulei sau organismului. De fapt, este posibil ca unele simptome neexplicate ale maladiilor virale acute să fie produse de interferon (Billiou și De Somer, 1980).

Prin aplicarea interferonului exogen în viroze nu trebuie să se aștepte să se obțină mai mult decît face interferonul produs spontan în timpul infecțiilor virale, adică o întîrziere în replicarea virusului și o atenuare a simptomelor. Se poate aștepta un efect bun din administrarea interferonului exogen numai dacă se obține o concentrație locală care depășește pe aceea rezultată din producerea spontană de interferon. În cazurile în care interferonul este aplicat topic la nivelul țesutului care trebuie protejat, este posibil să se obțină niveluri superioare acelora rezultate prin infecția virală însăși ; pentru administrarea sistemică puține din preparatele disponibile sînt destul de potente din acest punct de vedere.

Interferonul poate fi aplicat topic pe conjunctivă (picături), tract respirator (*spray* sau instilații), piele (geluri hidrofilice), poate fi injectat intravenos, intramuscular, intratecal sau prin puncție lombară. Interferonul leucocitar alfa sau interferonul obținut prin tehnica ADN recombinant are un timp de înjumătățire de 10 minute, administrat însă intramuscular sau subcutanat dă niveluri serice maxime la 4 ore și este detectabil pînă la 24 de ore. Este adsorbit și catabolizat de diverse țesuturi, în special ficat și rinichi.

Interferonul leucocitar difuzează greu în LCR, creier, umori apoase și vitroase, placentă și făt, ceea ce limitează eficiența tratamentului cu interferon exogen în encefalite, rabie, retinită cu virus citomegalic, infecții virale congenitale.

Pentru a obține rezultate pozitive trebuie administrat profilactic sau timpuriu în cursul infecției.

Studii efectuate în sistemul dublu orb controlat cu placebo au demonstrat eficacitatea interferonului leucocitar în profilaxia și tratamentul herpesului, zonei zoster la bolnavii normali și imunosupresați. S-a demonstrat capacitatea interferonului leucocitar și recombinant în scăderea și uneori eradicarea markerilor de replicare virală în hepatita cronică de tip B (Fontanges și colab., 1985). Efectele pozitive pe cazuri restrînse s-au obținut în infecțiile cu virus Papova (negi și papilomatoză laringiană juvenilă) și în febra hemoragică Ebola (Edmund și colab., 1977) (tabelul 12-III).

TABELUL 12-III

Administrarea clinică de interferon exogen în maladii de etiologie virală

Maladia	Tipul de interferon; calea de administrare	Rezultate	Investigator
1	2	3	4
Vaccinare variolică	IFN preparat pe celule *rhesus*, administrat subcutanat, o zi, în cicluri de vaccinare	protecție	Isaacs și colab. (1962)
Gripă cu virus gripal Hong-Kong (profilaxie)	IFN alfa, 1 000 U/mL, instilații intranazale, 3—7 zile	inhibă apariția simptomelor și prezența virusului	Soloviev (1969)
Gripă cu virus B (profilaxie)	IFN alfa, 8×10^5 U, instilație intranazală, cu 24 de ore înainte de inocularea virusului la voluntari și o oră după inoculare	prelungirea incubației; nu influențează simptomele bolii sau excreția virusului	Merigan (1975)
Infecție cu rhinovirus (profilaxie la voluntari)	IFN alfa, $1{,}8 \times 10^5$ U, intranazal, în 9 doze, începînd cu 20 de ore înainte de inoculare și 43 de ore după	nu reduce numărul cazurilor de boală și nu influențează simptomele	Tyrell (1973)
„	IFN alfa 140×10^5 U, intranazal, în 38 de doze, începînd cu 24 de ore înainte și 72 de ore după inoculare	reduce numărul cazurilor de îmbolnăvire (25 % reducere comparativ cu martorii netratați)	Tyrell (1973)

TABELUL 12-III (continuare)

1	2	3	4
Profilaxie față de infecții respiratorii dobîndite natural	IFN recombinant alfa 2, aplicat la 46 de familii, 5×10^6 U, zilnic, timp de 7 zile de la apariția primului caz în familie	78% din cazurile tratate au fost protejate față de infecția cu rhinovirus; nici o influență asupra afecțiunilor respiratorii de altă etiologie (virus gripal, paragripal, sincițial respirator)	Douglas și colab. (1986)
Keratoconjunctivite cu adenovirus	IFN alfa, aplicat profilactic — 800 U și terapeutic — 10 000 U	protejează 74% din contacți; vindecare în 72% din cazuri comparativ cu grupul placebo (42%)	Jamaniski (1982)
Herpes labial și genital recurent	IFN alfa, înglobat în unguent	accelerează vindecarea leziunilor și prelungește intervalul recurent	Ikic și colab. (1975)
Keratită herpetică	IFN alfa, 3×10^6 U/mL, 2 picături de 2 ori pe zi (tratament asociat cu debridare)	accelerează vindecarea și inhibă apariția virusului	Sundmachen (1977)
Keratită dendritică herpetică	IFN alfa, 30×10^6 U/mL, asociat cu alte tipuri de terapie antivirală (trifluorotimidine)	rezultate pozitive numai în tratamentul asociat	Myers (1982)
Zona zoster și varicelă la bolnavi cu maladii maligne	IFN alfa, $5{,}1 \times 10^5$ U/kg, intramuscular, 5 zile	scade numărul bolnavilor cu complicații viscerale	Jordan (1974)
Herpes diseminat la bolnavi imunosupresați	IFN alfa, 5×10^5 U, intravenos, de 2 ori pe zi, timp de 6 zile	ameliorare clinică la 2—3 zile de la începerea tratamentului	Moreb (1981)
Infecții virale la bolnavii cu transplant renal	IFN beta, 3×10^6 U, intramuscular, de 2 ori pe săptămînă, timp de 3 luni, administrat de la 1 oră după operație	nici o diferență între grupul tratat cu interferon și placebo	Weimar (1978)
Rubeolă congenitală la sugar	IFN alfa, 3×10^6 U pe zi, intramuscular, timp de 2 săptămîni	regresia viremiei	Larsson (1976)
»	IFN alfa, 7×10^5 U/kg	descreșterea tranzitorie a virusului în secrețiile nazofaringiene	Arvin (1982)
Hepatită cronică activă	IFN alfa, $6 \times 10^3 — 17 \times \times 10^4$ U/kg pe zi, intramuscular, tratament 10 zile — 1 lună	scăderea ADN asociat cu particula Dane, a AgHBc și a polimerazei ADN; pentru 10 zile de tratament — efect tranzitoriu	Greenberg (1976)
Papilomatoză laringiană juvenilă	IFN alfa, 2×10^6 U, intramuscular, de 3 ori pe săptămînă	bolnavii nu prezintă papiloame în timpul tratamentului; dacă terapeutica de întreținere este întreruptă, tumorile reapar	Attalach și colab. (1980)
Scleroză multiplă	IFN alfa, 2×10^6 U, intralombar, de 2 ori pe săptămînă, timp de 1 lună — 5 luni	ameliorarea simptomelor de boală la 5 din cei 10 bolnavi tratați	Jacobson (1982)

Lipsă de eficacitate a tratamentului cu interferon exogen a fost semnalată în maladia Creutzfeldt-Jakob (Kovanen și colab., 1980), PESS (Olding-Stenkvist și colab., 1982) și turbare (Chany, 1976 ; Stenkvist și colab., 1982).

12.2.10. CONCLUZII

Se știe că testările clinice cu orice drog sînt precedate în mod necesar de studii pe animale pentru testarea atît a eficacității, cît și a toxicității. În cazul interferonului, numărul cercetărilor experimentale pe animale care precedă aplicația clinică este remarcabil mai redus cînd se compară cu alte droguri folosite în alte domenii ale medicinii. Sînt puține sisteme-model pe animale de laborator care să reproducă fidel infecțiile virale umane care urmează să fie tratate cu interferon. Nu există sisteme-model satisfăcătoare pentru hepatitele virale, maladiile respiratorii acute, herpes sau infecții cu virus citomegalic recurente. Efectele adverse produse de interferon (febră, imunosupresie medulară, reactivitate locală), din cauza specificității de specie a interferonilor, nu pot fi reproduse decît la cimpanzei (Schellekens și colab., 1985).

Cercetările experimentale pe animale au dovedit că interferonul administrat înaintea inoculării virusului influențează favorabil evoluția unor infecții acute virale și, în unele cazuri, chiar cînd replicarea virusului la nivelul organului-țintă a început. Interferonul exogen modifică răspunsul gazdei atît față de infecțiile virale, cît și neoplazice. Problema importantă care va trebui rezolvată în viitor atît în modelele experimentale, cît și în virozele naturale nu se referă la faptul că interferonii influențează variate mecanisme de apărare ale gazdei, ci care dintre aceste mecanisme prezintă importanță în evoluția fiecărei viroze și modul cum funcționează. Pe această bază este posibil să se facă o selecție a unui anumit tip de interferon, mai adecvat într-o situație dată, a dozelor necesare și a regimului de administrare.

Analiza funcției interferonilor *in vivo*, situații în care ei reprezintă doar un singur component dintr-un sistem complex de comunicări intercelulare, dinamic și complet, este o problemă dificilă care rămîne să fie clarificată.

Bibliografie selectivă

DANIELESCU G., ADERCA I., IFTIMOVICI M. — Efectul inhibitor al interferonului preparat cu virus urlian inactivat pe diferite tulpini celulare, Stud. Cercet. Inframicrobiol., 1963, 14/2, 189—196.

DANIELESCU G., CAJAL N., BABOȘ A. și colab. — The action of interferon in the immunization of mice with influenza virus, Rev. Roum. Méd., Inframicrobiol., 1967, 4/1, 29—34.

DANIELESCU G., BARBU C., CAJAL N. și colab. — The presence of interferon and type A immunoglobulins in the nasopharingeal secretions of volunteers immunized with an inactivated influenza vaccine, Acta Virol., 1975, 19, 3, 245—250.

DANIELESCU G., BOTNARIUC I., MUȚIU A., CAJAL N. — Effect of IFN in virus transformed and tumour cell lines, Rev. Roum. Méd., Virol., 1983, 34, 3, 167.

DANIELESCU G., MANIU H., OPRESCU E., JUCU V., GEORGESCU T., CAJAL N. — Les effects antiprolifératif, et antiviral de l'interféron humain de type alpha sur des cellules tumorales, Rev. Roum. Méd., Virol., 1987, 38, 2, 83—93.

DANIELESCU G., MANIU H., GEORGESCU T., CAJAL N. — L'interféron gamma induit dans les leucocyts humains par la phytohémagglutinine ; production et caractéristique biologiques, Rev. Roum. Méd., Virol., 1988, 39, 2, 121—129

MANIU H. — L'interféron gamma (ou immun), Rev. Roum. Méd., Virol., 1987, 38, 4, 259—277.

METZ D. H., ESTEBAN M., DANIELESCU G. — The effector of IFM in the formation of virus polyribosomes in L-cells infected with vaccinia virus, J. Gen Virol., 1975, 27, 197—209.

SORODOC Y., DANIELESCU G., CEPLEANU M. și colab. — Response in measles antibodies of the guinea pig treated with IFN inductors, Rev. Roum. Méd., Virol., 1973, 10, 1, 73—80.

* * * — Interferon 1979, Gresser I. (red.), Academic Press Inc., New York.

* * * — Interferon and Interferon Inducers, Stringfellow D. A. (red.), Dekker Inc., 1980.

* * * — The Interferon System : A Review to 1982, Baron S., Dianzani F. și Stanton G. J. (red.), University of Texas Medical Branch, Galveston.

* * * — International Symposium in the Interferon System, A special meeting of the International Society for Interferon Research, Roma, 8—11.V.1985.

* * * — The Biology of the Interféron System, Stewart II W. W. și Schellekens H (red.), Elsevier Sci. Publ., 1986.

13

Chimioterapia antivirală

13.1. INTRODUCERE

În istoria științei, virusologia constituie un exemplu de devansare a teoriei de către practică, deoarece — deși ea are doar vîrsta secolului nostru —, primul vaccin eficient împotriva unei boli virale — variola — a fost folosit acum aproape 200 de ani de către Jenner care, la rîndul lui, a valorificat o îndelungată experiență a crescătorilor de animale. În condițiile în care virusurile nu erau încă cunoscute — dar și mult timp după descoperirea lor — vaccinurile au fost singurele posibilități de a combate cîteva dintre cele mai frecvente boli virale. Dar, deși sînt și astăzi deosebit de utile ca *mijloace profilactice,* ele nu reprezintă o soluție completă, fie că este vorba de viroze care nu beneficiază încă de un vaccin, sau că producția de vaccin nu poate acoperi necesitățile iar vaccinul nu poate ajunge în toate locurile unde este cerut, fie că este vorba de cazuri în care, din diverse motive, vaccinul nu poate fi eficient sau nu a putut fi administrat la timp și se cer *mijloace terapeutice*. Pentru compensarea acestor situații, se recurge astăzi la chimioterapie, disciplină a virusologiei moderne care are ca scop elaborarea de mijloace chimice — medicamente — de combatere a bolilor virale. În delimitarea sferei de mijloace ale chimioterapiei, accentul nu cade pe natura chimică a medicamentului, ci pe natura mecanismelor puse în joc. Astfel, vom considera produs chimioterapic, pe care-l numim medicament, acel compus chimic de sinteză sau de proveniență naturală care acționează prin blocarea acțiunii virusului — interzicerea pătrunderii în celula atacată sau/și blocarea multiplicării la un anume nivel al acestui proces — iar nu prin intermediul mecanismelor imunologice. Astfel nu vom considera imunomodulatorii ca mijloace chimioterapice. În ce privește interferonii, deși uneori interacționează cu sistemul imunologic, ei blochează multiplicarea virală tot pe cale biochimică intracelulară. În această măsură ei aparțin sferei chimioterapiei antivirale. În acest capitol însă nu ne vom ocupa de interferoni, întrucît acestora le este dedicat un alt capitol al acestui volum.

Faptul că agenții chimioterapici — care pot acționa și profilactic — se adresează proceselor biochimice care asigură multiplicarea virusurilor explică atît întîrzierea apariției acestei discipline, cît și numărul încă foarte mic de medicamente antivirale existente. Virusurile au fost descoperite în pragul secolului nostru, dar descoperirea naturii lor chimice și obținerea primului virus în stare cristalizată (virusul mozaicului tutunului) s-a petrecut abia în 1937, cînd Stanley avansează un nou concept — „virusul este o proteină“ — și inaugurează virusologia moleculară, precursoare a biologiei moleculare. Abia în deceniul al 5-lea s-au făcut primii pași către descifrarea episoadelor multiplicării virale la nivel biochimic și fiziologic, deschizîndu-se, totodată, primele căi între interferarea cu acestea și, în consecință, a posibilității opririi procesului de infecție virală. Astfel, fiecare descoperire în această direcție devenea obiectiv al chimioterapiei antivirale, strategia sa definindu-se pas cu pas ca fiind blocarea specifică a diverselor etape ale procesului de pătrundere, replicare și răspîndire a agenților patogeni virali, în urma lizei celulelor-gazdă, precum și a refacerii integrității celulelor atacate în mod direct sau indirect (tabelul 13-I).

TABELUL 13-I

Etapele procesului de infecție virală la om care pot fi obiective ale atacului agenților antivirali (după E. C. Herrman jr. și colab. în *„Viral Chemoterapy“*, 1984)

Întreruperea transportului la celula-gazdă susceptibilă
Blocarea adsorbției
Inhibarea penetrării
Prevenirea deproteinării genomului viral
Inhibarea transportului informației genetice virale
Inhibarea sintezei enzimelor virale și a proteinelor structurale
Inhibarea sau denaturarea acidului nucleic viral
Inhibarea sistemelor metabolice ale celulelor esențiale pentru replicarea virală dar neesențiale menținerii integrității celulare
Prevenirea asamblării și maturării particulelor virale
Prevenirea încorporării substanțelor celulare necesare particulelor virale (lipide)
Inhibarea eliberării virionilor din celulă
Neutralizarea sau blocarea proceselor biochimice patologice induse (toxemia)
Stimularea mecanismelor de apărare celulară
Stimularea mecanismelor de refacere celulară

Această largă listă de obiective actuale ale chimioterapiei antivirale arată nu numai ce se mai așteaptă, dar și cît de puțin s-a reușit pînă acum în privința mijloacelor chimice de stăvilire a infecțiilor virale.

Problema stabilirii unei strategii a chimioterapiei antivirale poate fi abordată și sub unghiul necesităților clinicii, cu deschidere directă către aspectele sociale și economice. În tabelul 13-II sînt ilustrate, într-o clasificare formală, virusurile împotriva cărora sînt necesare mijloace chimioterapeutice, în gazde uzuale și neuzuale.

TABELUL 13-II

Obiective ale chimioterapiei antivirale
(după H. P. Lambert şi colab., în „*Problems of Antiviral Therapy*", 1983)

Genom	Familie	Gazde uzuale	Gazde neuzuale
ADN	Parvo		
	Papova	V. papilloma	Grupul PML
	Adeno	Adenovirus uman	
	Herpes	HSV	HSV, VZV, CMV, EBV
	Pox	V. variolic	
	—	HBV	
ARN	Picorna	HAV Enterovirus uman 70	Rhinovirus
	REO	Rotavirus	
	Orthomyxo	V. gripal	
	Paramyxo	V. paragripal RSV uman V. rujeolic	V. rujeolic
	Corona		
	Toga	V. Denga V. febrei galbene	
	Bunya	V. febrei hemoragice (Congo)	
	Arena	V. febrei Lassa	
	Rhabdo	V. rabic	
	Filo	V. Bolii Marburg (febra hemoragică) V. bolii Ebola (febra hemoragică)	

13.1.1. CHIMIOPROFILAXIA ANTIVIRALĂ

De o egală importanţă cu cunoaşterea obiectivelor chimioterapiei virale şi a unor strategii de atingere a acestora este şi stabilirea momentelor — în raport cu desfăşurarea ciclurilor bolilor ce interesează — în care mijloacele chimice pot fi folosite cu şanse de reuşită. Imunizarea activă a fost şi continuă să fie mijlocul cel mai eficace de prevenire a virozelor, în special a acelora care se manifestă cu precădere ca epidemii sau, chiar, pandemii (de exemplu, gripa). Imunizarea pasivă a fost socotită ca un mijloc de tratament relativ puţin eficace. Intrarea în era producerii anticorpilor monoclonali va putea duce la o reevaluare a importanţei serurilor specifice, cunoscute fiind unele exemple în care anticorpii specifici pot avea un rol folositor atît în tratament, cît şi în profilaxie. În general, terapia virozelor — adică încercarea de a stăvili boala şi de a reface organismul după instalarea infecţiei virale şi, deci, a masivei multiplicări şi răspîndiri a agentului viral, inclusiv deteriorările celulare şi tisulare aferente — este lăsată pe seama mijloacelor chimice. Acestea sînt principalele posibilităţi de a opri replicarea virală, expulzarea virionilor din celulele atacate şi de a contribui la refacerea integrităţii metabolice a celulelor şi ţesuturilor ce au fost afectate.

Limitele sferei de acţiune a medicamentelor nu se opresc însă doar la tratament, ci se pot extinde şi în domeniul profilaxiei. Se cunosc agenţi chimici care acţionează prin blocarea adsorbţiei sau/şi penetrării, precum şi a fazelor timpurii ale ciclului de replicare virală (C. E. Hoffman şi colab., 1965 ; P. W. Choppin şi colab., 1981) (tabelul 13-III).

Tabelul 13-III

Folosirea preventivă a mijloacelor chimice (chimioprofilaxie virală)
(după H. P. Lambert, în „*Problems of Antiviral Therapy*", 1983)

Prevenire anteinfecţie	
Gripa	Amantadina
Prevenire postinfecţie	
Gripa	Amantadina
Herpes tip B (simian)	Aciclovir

La situaţia arătată în tabelul 13-III trebuie menţionat şi faptul (asupra căruia vom reveni) că sînt în curs de experimentare pe animale o serie de preparate de origine vegetală (hrean, usturoi, sfeclă, ridichi, lapte) care ar putea candida la un loc în acest tabel, alături de amantadină, în acţiunea de prevenire a infecţiei virale (V. Eşanu, E. Prahoveanu, 1984 ; 1985).

Transformarea chimioprofilaxiei virale într-un mijloc eficient şi larg răspîndit cere soluţii (agenţi, mod de folosire ş.a.) nu numai eficiente, dar şi simple şi sigure, în aşa fel încît un număr mare de persoane să le poată folosi regulat, în intervale mari de timp, fără avize medicale repetate. Practica a arătat că majoritatea procedeelor de prevenire a iniţierii unei infecţii virale se pot referi însă la un spectru viral şi o specificitate încă prea limitate. Cele două condiţii principale — specificitatea şi administrarea medicamentului înaintea infecţiei — reprezintă încă un serios handicap pentru aplicaţiile clinice ale mijloacelor chimioprofilactice. Totuşi, elaborarea unor medicamente cu efect profilactic în cazul unor myxovirusuri, prin blocarea selectivă sau inhibarea iniţierii infecţiei fără efecte negative asupra funcţiilor celulare, deschide perspective reale pentru lărgirea spectrului virusurilor împotriva acţiunii cărora se vor putea stabili mijloace profilactice de masă, cu efecte benefice, în perioadele în care posibilitatea declanşării unor epidemii este cea mai mare.

13.1.2. ASPECTE FARMACOCINETICE ŞI FARMACOLOGICE

Procesul de elaborare a unui medicament antiviral este foarte dificil, îndelungat şi costisitor. El s-a desfăşurat şi continuă să se desfăşoare pe două căi : empirică şi ştiinţifică. Aceste două orientări se referă la modul de abordare, la principiile de bază, iar nu la metodologie care, în ambele cazuri, este riguros ştiinţifică (constituirea loturilor experimentale, administrarea drogurilor, criteriile de apreciere a rezultatelor, prelucrarea datelor ş.a.).

Abordarea empirică este cea mai veche, întrucît nu „a avut nevoie“ de cunoaşterea mecanismelor procesului de infecţie virală, ci doar de şansa întîmplării fericite. Fie că a fost vorba de un screening „natural“, bazat pe practica seculară a popoarelor, fie că ne referim la screening-urile practicate în epoca virusologiei moderne pornindu-se de la criterii arbitrare sau cvasiarbitrare, trebuie recunoscut că pe această cale s-a ajuns la rezultate importante şi se poate, încă, spera la obţinerea unor rezultate pozitive şi în viitor.

Abordarea ştiinţifică este mai recentă, pentru că ea a devenit posibilă numai după descifrarea mecanismelor moleculare ale procesului de infecţie virală, întrucît se bazează pe posibilitatea de interferare cu reacţiile biochimice care alcătuiesc procesele de sinteză virală şi de producere a efectelor citopatice reversibile sau letale. Principiul de bază al acestor demersuri îl constituie exploatarea deosebirilor existente între proprietăţile fizice, fizico-chimice şi chimice ale acizilor nucleici celulari şi virali şi, mai ales, dintre proprietăţile enzimelor codificate de virusurile patogene şi cele omoloage, celulare. Astfel, ceea ce se caută sînt compuşii capabili să discearnă între cele două procese paralele şi componentele lor, blocînd doar procesul de replicare virală, fără a aduce daune celulei atacate. Cu alte cuvinte, principiul fundamental al chimioprofilaxiei şi chimioterapiei antivirale se bazează pe posibilitatea decelării şi folosirii acestor deosebiri, fie pentru a opri procesul de sinteză virală, fie pentru a-l „deturna“ prin alterarea informaţiei genetice, consecutiv unui acid nucleic cu structură anormală.

Cerinţele unor asemenea specificităţi şi lipse de toxicitate sînt însă doar poziţia de start în procesul de elaborare a unui produs antiviral cu eficienţă clinică şi tocmai faptul că la asemenea cerinţe deosebit de dificile — specificitatea şi netoxicitatea — se adaugă o sumă de condiţii suplimentare fac ca acest proces să fie deosebit de complicat, laborios şi costisitor.

Aceste condiţii suplimentare se pot grupa în două grupe, şi anume : *1*) condiţii referitoare la activitatea antivirală propriu-zisă şi *2*) condiţii privitoare la acţiuni secundare.

1. **Condiţii referitoare la activitatea antivirală propriu-zisă.** *Solubilitatea.* Pentru ca un medicament să-şi poată exercita efectul antiviral, el trebuie să poată ajunge la celulele-ţintă într-o cantitate şi un interval de timp suficiente pentru ca să asigure acţiunea sa specifică. Pentru a ajunge la ţinta sa, medicamentul trebuie să fie absorbit, transferat din vasele sanguine în lichidul extracelular şi transportat la celula asupra căreia trebuie să acţioneze. Toate aceste cerinţe şi fenomene sînt dependente de gradul de solubilitate a medicamentului în soluţie apoasă. Dacă un medicament nu este administrat în soluţie, atunci rata absorbţiei va depinde într-un grad important de procesul de solubilizare în fluidele organismului, precum şi de faptul dacă medicamentul poate depăşi bariera gastrointestinală prin difuziune simplă, transport activ sau facilitat ori prin pinocitoză. În asemenea caz se pro-

cedează la solubilizarea medicamentului într-un solvent organic — de exemplu, dimetilsulfoxidul (DMSO) — și apoi se diluează cu apă pînă cînd solventul devine netoxic (dacă nu devine medicamentul insolubil și precipită). În asemenea cazuri, testarea trebuie să fie astfel organizată încît să excludă — cu ajutorul loturilor-martor — orice posibilitate ca eventuala acțiune antivirală a soluției să nu fie datorată, într-o anumită măsură, acțiunii solventului însuși asupra celulei-gazdă. Uneori solvenții neapoși au efecte pozitive, cum este chiar DMSO care, în cazul idoxuridinei, nu numai că permite o solubilizare ridicată (40%) dar are și proprietatea de a facilita transportul medicamentului în celulă (B. E. Juel-Jenson, 1970). În cazul necesității unui tratament sistemic, solubilitatea este, de asemenea, foarte importantă. Un exemplu îl constituie vidarabina (ara-A) care, fiind slab aquosolubilă, nu poate fi administrată subcutanat sau intramuscular. Avîndu-se în vedere doza terapeutică (20 mg/kg), ar însemna ca unui pacient de 70 kg să i se infuzeze peste 3 L soluție (solubilitatea la 25°C este de 0,45 mg/mL). O asemenea situație ridică probleme uneori serioase și, chiar, limitative, ca de exemplu la pacienți cu deficiențe renale sau edem cerebral.

În unele cazuri, aquosolubilitatea poate fi crescută prin crearea unui derivat al compusului activ cu hidrofilie crescută față de cea a compusului activ de bază. Acest pro-medicament eliberează medicamentul prin acțiune metabolică. Ca exemple se pot da derivatul monofosforilat al ara-A (9-β-D-arabinoziladenina-5′-P, araAMP) (R. J. Whitley și colab., 1980) sau esterul acestuia cu acidul valerianic (de 20 de ori mai solubil în apă decît ara-A). În cazul derivatului 3′-5′-diacetilic al idoxuridinei, eficacitatea crescută se datorește liposolubilității crescute care facilitează trecerea barierei lipofilice a epiteliului, după care este hidrolizat, eliberîndu-se IDU, a cărei hidrofilie îi facilitează pătrunderea barierei stromale, în cazul uveitelor herpetice, și reduce efectele infecției virale (M. E. Hettinger și colab., 1981).

Asemenea modificări ale solubilității unor medicamente pot apărea ca fiind avantajoase din unele puncte de vedere. Ele vor fi, însă, reale numai dacă se vor acorda cu capacitatea de absorbție a țintei — pentru a nu deveni toxice — și dacă nu-și vor modifica timpul de înjumătățire. Altfel, tratamentul poate duce fie la toxicitate, fie la ineficiență, dacă structura ce se eliberează nu va poseda proprietăți care să o armonizeze cu setul de condiții necesare asigurării unei eficiențe crescute.

Stabilitatea. Pentru a fi supus testelor de laborator și clinice, un agent antiviral trebuie să fie stabil din punct de vedere fizic și, mai ales, chimic, atît în forma de păstrare, cît și după solubilizare.

Metabolizarea. Menținerea unei concentrații active în organism — condiție esențială pentru eficiența unui medicament — poate fi asigurată pe două căi principale : *a*) inhibarea enzimelor metabolizante și *b*) transformarea compușilor activi ce pot fi metabolizați enzimatic (și, deci, inactivați) în derivați rezistenți la acțiunea enzimatică. Iată cîteva exemple :

a) 5-iodo-2′-dezoxiuridina (IDU) poate fi transformată de uridinfosforilază, care desface nucleul uridinic (inclusiv cel dezoxiuridinic și timidinic). Administrarea dezoxiglucoziltiminei — un inhibitor specific al acestei enzime — a determinat o scădere semnificativă a metabolizării IDU și, în consecință, o creștere a concentrației sale în țesuturi (experiment efectuat pe pisici de P. Langen și G. Etzold, în 1966). La alte vertebrate, inclusiv omul, această soluție nu este valabilă, deoarece ele au încă o enzimă care poate metaboliza IDU — timidinfosforilaza —, dar care nu este inhibată de dezoxiglucoziltimină.

Un alt exemplu îl constituie ara-A, a cărei grupare aminică poate fi metabolizată de adenozindezaminază. Dezaminarea ara-A poate fi prevenită prin acțiunea unor inhibitori ai acestei enzime, așa cum sînt 2′-dezoxicoformicina sau eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)-adenina. Acești doi inhibitori se aseamănă prin acțiunea specifică, dar se și deosebesc prin faptul că primul produce o inhibiție ireversibilă, pe cînd efectul inhibitor al celuilalt este reversibil (T. W. North, S. S. Cohen).

b) În unele cazuri, un compus activ poate fi modificat chimic pentru a-l face rezistent la acțiunea enzimelor serice și/sau tisulare, fără a-i reduce din calități și fără a fi transformat, *in vivo,* în compusul originar.

2. **Condiții privitoare la acțiuni secundare.** Un compus chimic (amestec de compuși, extract tisular ș.a.) care îndeplinește condițiile discutate pînă acum trebuie să mai îndeplinească un set de condiții privitoare la eventuale acțiuni secundare negative : să nu inducă rezistență celulară și/sau tisulară, fapt care l-ar scoate din uz ; să nu inducă addicție, ceea ce ar putea duce la intoxicare prin supradozaj ; să nu acționeze ca imunosupresor, prejudiciind capacitatea de apărare a sistemului imun ; să nu fie teratogen ; să nu acționeze ca mutagen ; să nu fie oncogen ; să nu producă tulburări ale hematopoiezei.

Toate aceste condiții, la care trebuie adăugat și aspectul economic — produsul trebuie să fie, comparativ, ușor de preparat și ieftin — fac ca randamentul producerii unui medicament antiviral eficient să fie foarte scăzut, raportul medicament utilizat/compuși testați să fie de ordinul $1:10^5$.

13.1.3. PROBLEME ALE TESTĂRII MEDICAMENTELOR

O problemă majoră a testării compușilor presupuși cu acțiune antivirală este incertitudinea extrapolării la animale și, în special, la om a rezultatelor testărilor pe culturi de celule sau ouă embrionate. Cu o probabilitate sensibil mai mică, dar reală, se poate petrece și fenomenul invers, cînd compuși care nu au dat rezultate în testările pe culturi de celule sau ouă embrionate s-au dovedit destul de activi la animale și chiar la om. Aceasta este motivația unor autori de a testa compușii-candidat direct pe animale, renunțînd la faza de testări *in vitro.*

Extrapolările trebuie minuțios asigurate nu numai la granițele *in vitro-in vivo,* ci și la cele interregn și, chiar, interspecii. Se pot obține rezultate contradictorii atunci cînd testele se efectuează pe celule de proveniențe diferite sau pe mai multe specii. Contradicții în rezultatele testărilor se pot ivi chiar la o aceeași specie, căci sexul, vîrsta, starea fiziologică ș.a. influențează mult reactivitatea organismului. În plus, fiind influențate semnificativ de bioritmuri, rezultatele pot diferi în funcție de ora de administrare (dimineața, seara) a medicamentului. Această dependență este cu atît mai strînsă cu cît organismul este mai evoluat și mai complex determinat (bio-socio-cultural). Nerespectarea momentului optim al administrării medicamentului în raport cu cel al inoculării virusului este o altă cauză a variației rezultatelor, întrucît este foarte important în care fază a ciclului de replicare și de răspîndire a virusului a intervenit agentul antiviral. În fine, inconstanța căilor de administrare a medicamentului, în cadrul aceluiași experiment — instilație intranazală, cale subcutanată, intramusculară sau intravenoasă, aerosol sau gavaj ș.a. — constituie, nu arareori, surse de nepotrivire a rezultatelor și de erori în concluzii.

Corectitudinea organizării experimentelor și a prelucrării datelor este un factor deosebit de important în stabilirea calităților chimioterapice sau chimioprofilactice ale unei agent-candidat la calitatea de medicament antiviral. Rezultatele depind semnificativ de modul de alcătuire a loturilor experimentale (animale sau oameni) și de factori ca: numărul de indivizi, starea acestora, numărul de loturi, hrana, martorii, eliminarea oricărei posibilități de influențare a experimentatorului de vreun factor subiectiv ș.a., jucînd un rol esențial în posibilitatea detașării unor concluzii corecte. Această corectitudine nu poate fi asigurată pînă la ultima consecință decît prin prelucrarea statistică, corectă, a datelor obținute, căci calculul asigurării statistice a diferențelor între loturi trebuie făcut adecvat tipului de experiment, condițiilor și scopului urmărit. Pe cît este de prețioasă prelucrarea statistică făcută corect, pe atît de înșelătoare pot fi concluziile, atunci cînd se folosesc formule diverse dar neadecvate complexului de condiții și scopuri ale experimentului.

13.1.4. ASOCIEREA MEDICAMENTELOR ANTIVIRALE

În urma asocierii medicamentelor antivirale se pot obține efecte de trei tipuri:

1. *Antagonism* — cînd un anumit compus, de obicei fără proprietăți antivirale, interacționează cu un compus activ micșorînd, anulînd sau inversînd efectul acestuia.
2. *Sinergism* — cînd efectele compușilor asociați se însumează algebric.
3. *Potențare* — cînd efectul total al amestecului este mai mare decît suma algebrică a efectelor fiecărui component în parte.

O asociere care poate genera efecte de sinergism sau potențare poate aduce importante avantaje.

Unii compuși pot bloca procesul unei infecții virale, dar la concentrații la care sînt toxici. Printr-o asociere potențatoare, s-ar putea ca aceștia să poată fi folosiți, cu cel puțin aceeași eficiență, la concentrații mai mici, aflate sub pragul de toxicitate.

Asocierea de compuși activi poate accelera inactivarea unor tulpini virale sensibile. În aceste cazuri, efectul s-ar datora nu atît acțiunii inactivante asupra virionilor luați în bloc, cît proprietăților diferiților compuși de a inactiva diferite clone aflate în diferite stadii de replicare și în diferite locuri caracterizate prin condiții locale diferite (pH, osmolaritate ș.a.). Se așteaptă ca asocieri de medicamente să inactiveze replicarea virală, mai ales în perioada exprimării clinice a virozelor. Pentru atingerea acestui scop este nevoie de compuși activi ale căror mecanisme și locuri de acțiune să fie diferite.

O altă problemă care ar putea fi soluționată pe această cale este apariția tulpinilor rezistente. Se știe că în unele infecții bacteriene, rata apariției de mutante rezistente este de 10^{-5} — 10^{-8}. În privința infecțiilor virale, s-a constatat, de asemenea, apariția unei rezistențe selective (J. H. Field, G. Darby, 1980 ; C. D. Sibrack și colab., 1982), dar mai există semne de întrebare privitoare la frecvența genelor de rezistență, rata apariției mutantelor rezistente și importanța lor clinică. În cazurile în care rezistența tulpinilor ridică probleme serioase, administrarea de combinații de medicamente ar putea contribui la găsirea de soluții utile.

Infecțiile virale persistente, în special cele latente, constituie un alt cîmp în care asocierea de medicamente ar putea să-și găsească un loc de acțiune. Fie că este vorba de particularități, încă insuficient de bine cunoscute, ale activității replicative lente, fie că această activitate are loc și în alte celule decît cele neuronale (E. J. Homan, B. C. Easterday, 1982) sau în alte condiții, administrarea de compuși activi, în asociere, în diferite formule, ar putea, de asemenea, aduce un însemnat aport la terapia sau chiar la eradicarea unor boli virale.

13.1.5. TRANSPORTUL MEDICAMENTELOR LA ȚINTELE LOR

Una dintre principalele probleme ce trebuie rezolvate la trecerea de la testările *in vitro* la cele *in vivo* este cea a transportului medicamentului la ținta sa. Drumul moleculelor active de la calea de acces pînă la țesuturile infectate în celulele cărora trebuie să pătrundă și asupra cărora trebuie să acționeze este, uneori, lung, cu mai multe bariere ce trebuie trecute fără a se degrada și a-și micșora concentrația — la nivelul țintei — sub pragul activității optime. Întrucît atingerea cu o cît mai mare specificitate a celulelor-țintă, într-o concentrație optimă pentru asigurarea acțiunii antivirale, este o problemă esențială în profilaxia și/sau terapia chimică antivirală, s-au încercat mai multe soluții :

a) *Lipozomii* sînt vezicule microscopice (1—10 μm în diametru) ce se obțin prin dispersia apoasă a unor fosfolipide și care, în fapt, reprezintă compartimente apoase limitate de duble straturi lipidice uni- sau multilamelare. Cînd dispersia se face într-o soluție ce conține un compus dizolvat, acesta este încorporat în lipozomi, transportat de aceștia și eliberat la locul de țintă, lipozomii fiind biodegradabili și netoxici. Ei pot fuziona cu membrana plasmatică a unei celule și elibera conținutul în ea sau pot fi endocitați (W. H. Prusoff, M. J. Otto, 1983). Această tehnică poate asigura nu numai protejarea medicamentului de agenții ce-l pot degrada (enzime ș.a.) în vasele sanguine, dar prin aceasta măresc timpul de existență a medicamentului transportat, funcționînd ca un sistem intravascular de eliberare treptată a acestuia și, deci, de menținere a concentrației active un timp mai îndelungat. În plus, lipozomii pot fi folosiți pentru a introduce în celule compuși care, de obicei, nu pot pătrunde sau pătrund cu greutate, în mod natural (de exemplu, compușii foarte ionizați ș.a.) (G. Gregoriadis, 1973 ; J. L. Juliano, 1981).

S-a reușit pe această cale încapsularea ara-A și transportarea sa la plămîn, în experimente efectuate pe șobolani. În experimente cu 5-iododezoxiuridină în tratamentul unor keratite herpetice la iepuri s-a reușit, tot pe această cale, chiar o creștere a eficienței datorită, probabil, penetrării mai profunde a produsului (Smolin, 1981).

b) *Lipozomi plus hipertermie.* Rezultatele pozitive observate în tratamentul unor tumori experimentale la șoareci, consecutiv unei încălziri a tumorii la 42°C — obținîndu-se o concentrație de medicament, la nivelul acesteia, mult mai mare ca în cazul tumorii neîncălzite — sugerează posibilitatea aplicării unei asemenea tehnici și în cazul terapiei sistemice a herpesului genital, de exemplu, prin încălzirea locală a regiunii afectate (W. H. Prusoff).

c) *Lipozomi plus anticorpi.* Precizia țintirii compusului activ poate fi semnificativ îmbunătățită prin atașarea la lipozomi a unor anticorpi specifici țintei. Astfel, asocierea unor anticorpi antivirali ar putea duce la o interacțiune specifică cu antigenul viral aflat la suprafața celulei infectate (V. K. Jansons, P. L. Mallett, 1981).

La rîndul ei, specificitatea acestei interacțiuni poate fi mult ameliorată prin folosirea anticorpilor monoclonali. Virusurile au capacitatea de a determina formarea de anticorpi neutralizanți, fie prin antigenele proprii, fie prin antigenele produse și fixate la suprafața membranei celulei infectate sau transformate. Virusul herpetic, de exemplu, determină apariția a 5 glicoproteine atît la suprafața membranei proprii, cît și a celei a celulei infectate. Aceste celule pot fi precipitate de seruri imune specifice acestor antigene, dar se poate acționa și cu anticorpi monoclonali specifici doar unui antigen din cei 5 și produce citoliza. Cercetări recente (R. D. Dix și colab., 1981) au arătat că, acționînd cu anticorpi anti-gC sau anti-gD, se poate obține o reducere a diseminării HSV, ca și a gravității bolii neurologice acute, în infecțiile experimentale la șoareci. Interesant este faptul că protecția anticorpilor monoclonali apare la administrarea lor atît la 2 ore înaintea infecției, cît și la 24 de ore după inocularea HSV. Rezultate foarte bune au fost obținute și în infecția experimentală la șoareci cu virusul leucemic Rauscher cînd s-a reușit o vindecare completă a eritroleucemiei induse de acest virus prin tratare cu anticorp monoclonal (anti-gp70) la 72 de ore după inocularea virusului (D. A. Scheinberg, M. Strand, 1982).

d) *Țintirea magnetică.* S-au făcut încercări, cu rezultate încurajatoare, de a folosi microsfere albuminice ce conțin un anume compus activ alături de Fe_3O_4 și a dirija orientarea acestora către țintă. S-a obținut un aflux de 50—80% microsfere în zona țintită, ceea ce poate face posibilă scăderea concentrației medicamentului și, astfel, scăderea toxicității, în același timp cu menținerea activității.

Țintirea magnetică a medicamentelor ar putea constitui un procedeu util pentru acumularea lor la locul unde trebuie să acționeze, cu un grad crescut de selectivitate (A. E. Senyei, K. J. Widder, 1981).

e) *Iontoforeza* este o tehnică prin care compuși (activi) ionizați pot fi transportați de către un cîmp electric creat în zona dorită. Energia electrică eliberată dirijează compusul ionizat prin membrane sau piele. Rezultate bune s-au obținut prin aplicarea, pe această cale, a unei soluții de IDU 0,1% pe aria cu infecție herpetică mucocutanată, folosind un curent de 0,5—0,8 mA, timp de 10 min. S-au obținut vindecări în 36 de ore, față de 10—14 zile cît s-a înregistrat la martor (M. D. Lekas, 1979). Alți autori raportează o reducere a timpului de vindecare cu 63% în cazuri de herpes orolabial (L. P. Gangaroza și colab., 1982). Rezultate pozitive s-au obținut și cu araAMP (iontoforeză catodică).

Un avantaj important îl reprezintă minimizarea toxicității sistemice datorită cantităților reduse de compus activ transportate la ariile țintite.

f) *Modificarea selectivă a membranelor.* Bazat pe faptul că membranele celulelor infectate cu virusuri sînt modificate structural și funcțional, Carrasco (1978) arată că ele pot permite intrarea unor compuși — ce pot avea și acțiuni antivirale, așa cum este, de exemplu, GppCH$_2$p, un analog al GTP — și care nu pot penetra prin membranele celulelor neinfectate. Asemenea modificări ale permeabilității induse viral — care au fost observate în infecțiile cu picorna-, toga-, papova-, herpes-, rhabdo- și paramyxovirusuri — produc și un dezechilibru ionic și al unor rezerve de compuși metabolici, care se răsfrîng asupra metabolismelor viral și celular. Celulele infectate lasă să iasă ioni de K$^+$ și să intre cei de Na$^+$, ceea ce produce o inhibare a translocării ARNm viral ca urmare a modificării afinității acestuia pentru ribozomi. Dezechilibrul ionic are și alte efecte ca : scăderea rezervei de aminoacizi și nucleotide, ca urmare a scurgerii lor din celulă și a inhibării transportului de aminoacizi în celulă ș.a.

S-a sugerat că agentul antiviral, care ar putea acționa pe baza unui asemenea mecanism, nu ar trebui să depășească o greutate moleculară de aproximativ 1 500 daltoni, să fie un puternic inhibitor *in vitro* și foarte ionizat, pentru a nu fi absorbit de celulele normale. S-au obținut rezultate promițătoare în infecții cu virusurile vaccinal și herpetic. Se pare că membranele virusurilor sînt mai sensibile la perturbații ale compoziției mediului, decît cele celulare. Studii ale mecanismelor implicate în asemenea modificări selective induse viral sînt în curs de desfășurare. Bazîndu-se tocmai pe deosebiri de selectivitate între celulele infectate și cele normale, realizînd, deci, pe cale fiziologică multe din calitățile celorlalte procedee de asigurare a selectivității, metoda este de perspectivă.

g) *Fluxul neuronal centripet.* În cazul unor infecții lente în care virusuri neurotrope — ca cel herpetic și al varicelei — se retrag în ganglionii nervoși, de unde, prin reactivare, pot migra axonal centrifug, s-ar putea încerca prevenirea infecțiilor recurente prin transferarea unui medicament, tot pe cale axonală dar centripetă, cu efecte de sterilizare virală, în condițiile în care are loc o lentă dar continuă replicare.

Un complex proteic, care să fie prelucrat de terminațiile nervoase și care să migreze axonal centripet, s-a arătat a fi peroxidaza din hrean. Legîndu-i-se chimic o moleculă a unui compus activ (5-iodo-5′-amino-2′, 5′-didezoxiuridina) s-a obținut — sub control autoradiografic — transportul acestui complex în ganglionii trigeminali la șoarece la 24 de ore după administrare prin injecție corneană (R. H. Hatscke și colab., 1980). Această metodă ar putea fi de mare perspectivă dacă s-ar putea asigura prezența efectivă, în stare funcțională și în concentrația necesară, a compusului activ antiviral.

13.2. AGENȚI ANTIVIRALI

Dintre multele mii de compuși sau preparate, de sinteză sau de origine naturală (în marea lor majoritate de origine vegetală), doar o mică parte au dovedit virtuți antivirale, iar dintre acestea, doar o foarte mică parte a fost reținută de clinica umană. În primul rînd, acestea din urmă dar și multe dintre cele la care s-a renunțat — din cauza unor efecte secundare negative, reale sau potențiale — au fost studiate și biochimic, pentru a li se putea descifra metabolizarea și, în ultimă instanță, mecanismele lor de acțiune, modul de transport la țintă ș.a.

În cele ce urmează vom descrie principalii agenți antivirali pe grupe de structuri chimice care, în linii mari, corespund și principalelor mecanisme de acțiune. Limitarea acestei descrieri doar la cele cîteva medicamente utilizate în clinică ar sărăci considerabil imaginea modalităților de acțiune asupra prevenirii și/sau desfășurării bolilor virale și a criteriilor de promovare a altor compuși activi, dar cu nedorite acțiuni asociate. Pe de altă parte, prezentarea tuturor agenților chimici și fizici care au candidat la titlul de medicament sau procedeu de acțiune antivirală *in vivo,* dacă ar fi posibil, nu ar fi utilă deoarece ar încărca această imagine cu elemente nesemnificative, care ar putea estompa claritatea imaginii pe care dorim s-o avem.

13.2.1. ANALOGI NUCLEOZIDICI

Una dintre principalele strategii folosite în chimioterapie — inclusiv în cea antivirală — este de a oferi celulelor atacate compuși asemănători (analogi) celor care iau parte în mod natural la biosinteza acizilor nucleici sau/și a proteinelor. Acești analogi se substituie celor naturali, fie în structura acestor macromolecule, fie în cea a substraturilor unor enzime implicate în aceste biosinteze. În aceste cazuri, agentul patogen — în cazul nostru virusul infectant — nu-și mai poate îndeplini, parțial sau total, funcțiile, analogul modificînd informația genetică sau structurile secundară și terțiară a acizilor nucleici.

În cazul nucleozizilor se pot obține trei clase de analogi prin modificări la nivelul : *a*) bazelor purinice sau pirimidinice, *b*) glucidului, *c*) și a bazei și a glucidului.

13.2.1.1. *Analogi nucleozidici prin modificări în nucleele purinice sau pirimidinice*

5-iodo-2′-dezoxiuridina (IDU ; IdUrd ; IUDR) se obține prin înlocuirea grupării metil a timidinei cu un atom de iod (fig. 13-1).

IDU are o importanță istorică, fiind primul compus de sinteză folosit în clinica umană, dovedind o clară eficiență în vindecarea keratitelor herpetice (H. E. Kaufman, 1962). Tot acest compus a prilejuit prima demonstrare a necesității existenței dezoxiribozei în molecula analogului nucleozidic, compușii omologi care conțin riboză fiind ineficienți.

IDU mai are o dublă importanță — istorică și practică — fiind capul de serie al unei categorii de medicamente antivirale eficace în cazul infecțiilor virale. Asemenea tip de medicament antiviral poate aduce mari servicii în fazele inițiale ale unei epidemii sau cînd se dorește oprirea transmiterii unei infecții contagioase. În mod special, aceste medicamente sînt utile în infecția herpetică recurentă.

IDU este eficientă față de paleta largă de virusuri în care figurează virusurile ADN (herpes simplex, pseudorabic, vaccinal, adeno și polyoma) și virusurile ARN oncogene ca, de exemplu, virusul sarcomului Rous datorită, probabil, încorporării IDU în ADN format ca urmare a acțiunii reverstranscriptazei. Nici un alt virus ARN, cu excepția virusului Columbia-SK, nu s-a dovedit sensibil la acțiunea IDU.

Medicament cu aplicație locală, IDU și-a dovedit utilitatea clinică și în alte forme de herpes : panarițiul herpetic, herpesul genital, cutanat, zona zoster. În soluții concentrate de dimetilsulfoxid (DMSO) s-a dovedit activ și în terapia leziunilor și panarițiilor vaccinale. Eficacitatea IDU în encefalita herpetică este controversată.

Un dezavantaj al folosirii IDU îl constituie inducerea unei rezistențe față de acțiunea sa, mult mai ușor *in vitro* decît *in vivo*. După unii autori, această rezistență s-ar datora unei scăderi a sintezei de timidinkinază (TK) codificată de virus, dar după alții ar fi vorba de o diminuare a afinității IDU față de TK sau a IDUTP (IDU-trifosfat) față de HSV-ADN polimeraza (A. Hirano și colab.). Se mai citează date care

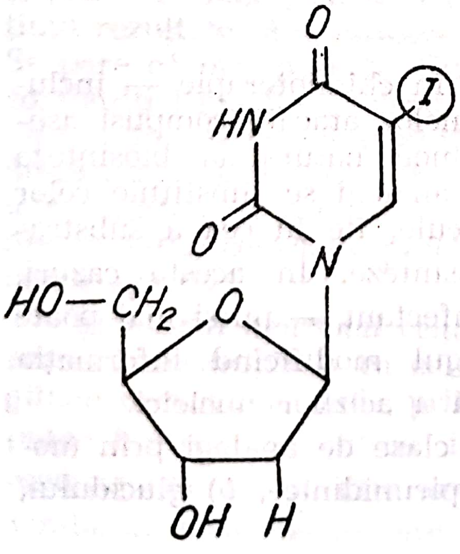


Fig. 13-1 — Structura IDU.
○ — locul unde gruparea CH_3 a timinei a fost înlocuită cu un atom de iod.

relevă curioasa proprietate a IDU de a avea un efect de stimulare a replicării virale atunci cînd este administrată înainte de infecția virală, în scop profilactic. De asemenea, se citează cazuri de inducere a replicării unor virusuri în urma tratamentelor cu IDU (virusul leucemic murin, virusuri de tip C la diverse mamifere ș.a.). Este controversat efectul oncogen în terapia cu analogi halogenați.

În privința mecanismelor de acțiune, sînt implicate trei domenii în care acționează IDU sau derivații săi fosforilați (fig. 13-2) : *1)* inhibarea competitivă a unor enzime implicate în biosinteza timinei-ADN (TK, timidilatkinaza și ADN polimeraza) ; *2)* inhibarea alosterică sau prin *feed-back* de către IDUTP a unor enzime reglatoare (TK, dezoxicitidilatdezaminaza și ribonucleoziddifosfatreductaza) ; *3)* alterarea expresiei genice, ca urmare a încorporării IDU în ADN.

Cele două tipuri de inhibare enzimatică sînt competitive și ușor reversibile, dar încorporarea în ADN nu este reversibilă. Aceasta a determinat să se considere că acest eveniment metabolic este răspunzător atît de toxicitatea, cît și de efectul antiviral al IDU.

Alterarea expresiei genice se produce ca urmare a încorporării IDU în ADN, ceea ce are cel puțin trei efecte : *a)* formarea de perechi de baze mai curînd cu guanina decît cu adenina. Acest fenomen are loc datorită faptului că la pH fiziologic IDU depășește cu mult timidina în privința proporției, atît a formei ionizate, cît și a celei enolice, ceea ce face ca IDU să formeze perechi preferențial cu guanina. Aceste erori de împerechere pot duce la alterări structurale și funcționale ale enzimelor și proteinelor structurale rezultate din translația ARNm derivat din ADN substituit ; *b)* aceleași efecte asupra structurii proteinelor pot

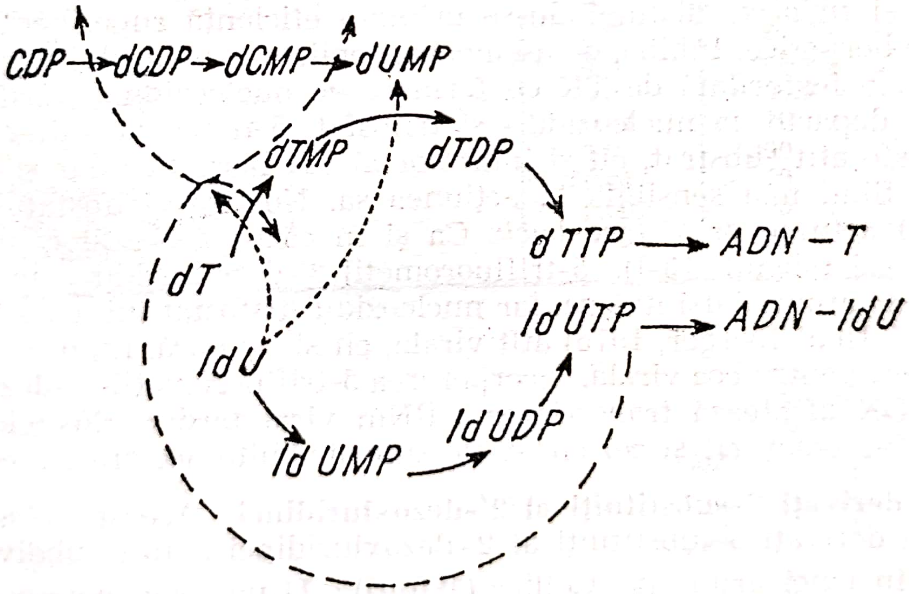


Fig. 13-2 — Locurile de inhibare cu IDU și derivații săi fosforilați.

CMP, CDP — citidinmono- și difosfat ; *d* — dezoxi ; *I* — iod ; *U* — uridină ; *T* — timidină ; *UMP, UDP, UTP* — uridinmono-, di-, trifosfat ; *TMP, TDP, TTP* — timidinmono-, di-, trifosfat ; - - -⟩ — inhibiție competitivă ; ———⟩ — inhibiție alosterică sau prin *feed-back*.

deriva și ca urmare a alterării informației în urma includerii analogului în ADN ; *c)* includerea analogilor halogenați poate duce la creșterea afinității de legare a ADN substituit, de proteine specifice (receptori hormonali ș.a.). Această creștere a afinității este cea mai mare în cazul substituirii metilului cu iod. Urmează, în ordine, analogii substituiți cu brom și, respectiv, clor. Timina are afinitatea cea mai mică.

Deși majoritatea efectelor biologice ale IDU sînt atribuite, în cea mai mare parte, încorporării sale în ADN, se pare — după unii autori — că există și alte căi de acțiune, cum ar fi cele în urma cărora este modificat procesul de sinteză a glico- și mucopolizaharidelor asociate cu membranele celulare externe.

Trebuie menționat că baza activității antivirale a IDU nu constă atît în atacul specific al unei unice funcții virale — adsorbția, transportul în celulă, demantelarea, inhibarea unei enzime virale sau codificate de virus, încorporarea în ADN viral ș.a. — cît, mai ales, în inducerea unei diferențe cantitative a TK în celula infectată față de cea neinfectată. Creșterea cantității de TK duce la acumularea preferențială a IDU-fosforilată, cu efecte letale rezultate din încorporarea acesteia atît în ADN viral, cît și în cel celular. Tulpinile virale care nu codifică TK sînt complet rezistente la acțiunea IDU cînd celulele-gazdă sînt de asemenea TK-deficiente.

5-F(Br, Cl)-2′-dezoxiuridina. Toți acești derivați halogenați omologi IDU au fost mult studiați comparativ, pe toate planurile. Toți acționează în același sens cu IDU, cu particularități și mod de acțiune comparabile cu IDU. Din acest grup (menționăm că s-a sintetizat și studiat chiar și *derivatul astatinic,* astatina aparținînd grupului halogenilor) este de reținut derivatul fluorurat, respectiv trifluorurat : *5-trifluorometil-2′-dezoxiuridina* (F_3T). Acest derivat are o bună activitate antiherpetică, atît *in vitro,* cît și *in vivo,* distingîndu-se printr-o eficiență superioară IDU în keratitele herpetice. Inhibă, de asemenea, replicarea virusului vaccinal. Ca și IDU, este fosforilată de TK cu formare de nucleozidmonofosfat — și, apoi, mai departe, la nucleoziddi- și trifosfat. 5-trifluorometil-2′-dezoxiuridina este atît substrat, cît și inhibitor al TK herpetice dar și celulare, TK-HSV fiind mai sensibilă la acțiunea sa. Nucleozidtrifosfatul exercită aceeași acțiune prin *feed-back.* Ca și în cazul derivaților fosforilați ai IDU (vezi tabelul 13-I), 5-trifluorometil-2′-dezoxiuridina monofosfat inhibă dezoxitimidilatsintetaza, iar nucleozidul trifosfat inhibă ADN polimeraza (C. Heidelberger, 1975) atît virală, cît și celulară, fiind un substrat mai eficient pentru cea virală. Încorporarea 5-trifluorometil-2′-dezoxiuridinei în ADN afectează transcrierea ARNm viral tardiv. Efectele asupra virusului vaccinal, cît și cel citostatic sînt atribuite acelorași mecanisme.

Alți derivați 5-substituiți ai 2′-dezoxiuridinei. Această clasă foarte bogată în derivați 5-substituiți ai 2'-dezoxiuridinei a fost subdivizată de DeClerq în cinci grupe (în Collier-Oxford) : *1)* un grup neimportant ca acțiune antivirală ; *2)* un grup cu acțiune inhibitoare similară atît asupra HSV, cît și asupra virusului vaccinal. Cei mai reprezentativi compuși sînt : IDU, F_3T, *5-fluoro-dU, 5-bromo-dU, 5-formil-dU, 5-etil-dU, 5-etinil-dU, 5-(1-clorovinil)-dU, 5-hidroximetil-dU, 5-hidroxi-dU, 5-tiociano-dU.* Dintre acestea, cel mai mare index antiviral (concentrația toxică/concentrația minimă activă *in vitro*) îl are 5-etil-dU ; *3)* un grup care inhibă selectiv virusul vaccinal și în mai mică măsură HSV ; *4)* un grup care inhibă semnificativ HSV și în mai mică măsură virusul vaccinal. Cei mai reprezentativi compuși ai acestui grup sînt : *5-vinil-dU, (E)-5-(2-bromovinil)-dU, (E)-5-(2-iodovinil)-dU ; (E)-5-(2-clorovinil)-dU, 5-propil-dU, 5-metoximetil-dU, 5-metiltiometil-dU, 5-azidometil-dU, 5-metilamino-dU, 5-etilamino-dU și 5-propiniloxi-dU*. Indexul antiviral crește de la clasa 1 către clasa 4. Din acest din urmă grup se detașează ca activitate antivirală, în special anti-HSV, 5-(halogenovinil)-2′-dezoxiuridinele, cel mai activ fiind bromovinilderivatul (tabelul 13—IV) (fig. 13—3).

TABELUL 13-IV

Activitatea relativă și selectivitatea 5-substituit-2′-dezoxiuridinelor ca agenți anti-HSV în culturi de celule primare de rinichi de maimuță
(DeClerq și colab., în „*Developments in Antiviral Chemotherapy*“, 1980)

Compus	Activitate antivirală (A)	Activitate antimetabolică (B)	Index de selectivitate (B/A)
5-fluorometil-dU	0,2	0,05	0,25
5-formil-dU	2,0	0,5	0,25
5-etinil-dU	0,1	0,1	1
5-(1-clorovinil)-dU	0,4	0,5	1,25
IDU	0,2	1,2	6
5-etil-dU	1,0	30,0	30
5-azidometil-dU	0,7	30,0	43
5-propiniloxi-dU	0,7	50,0	70
5-metiltiometil-dU	4,0	>400,0	100
5-metilsulfonilmetil-dU	4,0	>400,0	100
5-vinil-dU	0,04	10	250
5-propil-dU	1,0	300	300
(E)-5-(2′-iodovinil)-dU (IVDU)	0,01	70	7 000
(E)-5-(2′-bromovinil)-dU (BVDU)	0,007	70	10 000
(E)-5-(2′-clorovinil)-dU (CVDU)	0,02	>200	10 000

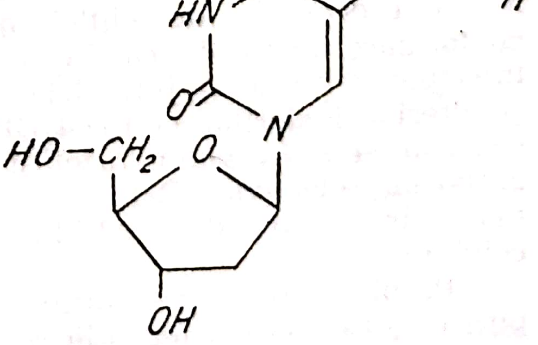


Fig. 13-3 — 5-(2-halogenovinil)-2′-dezoxiuridină.
X — Cl (CVDU) ; Br (BVDU) ; I (IVDU).

BVDU, CVDU și IVDU s-au dovedit inhibitoare ale replicării HSV-1 la doze deosebit de mici ; doza medie corespunzătoare DI_{50} este în jur de 0,01 µg/mL. Pentru a acționa asemănător asupra HSV-2 au fost necesare concentrații de 100—200 de ori mai mari. Acești compuși sînt slab activi sau inactivi împotriva virusului vaccinal, virusului stomatitei veziculoase, ca și împotriva virusului citomegalic. BVDU și IVDU inhibă virusurile varicella-zoster, pseudorabic (PRV), hepatitic bovin de tip 1 și al varicelei simiene, semnificativ mai eficient decît alți inhibitori cunoscuți ca : 5-iodo-2′-dezoxicitidina, acidul fosfonoacetic, ara-T, iodoaminodidezoxiuridina, care pentru acțiuni comparabile necesită concentrații cu unul sau cîteva ordine de mărime mai mari.

Eficacitatea și selectivitatea acestui grup și, în special, a BVDU se datorează proprietăților sale de a fi un foarte specific substrat al TK virale — și mult mai puțin specific al TK celulare — care, acționînd și ca timidilatkinază, fosforilează BVDU la BVDUMP și, apoi, la BVDUDP (ceea ce împiedică o acțiune ulterioară asupra celulei infectate). Derivatul trifosforilat — obținut prin acțiunea TK celulare — este un inhibitor mult mai eficient al ADN polimerazei virale decît al celor celulare (α, β și γ). În plus, este specific încorporată în ADN viral, cantitatea încorporată fiind strict corelată cu activitatea anti-HSV. Deci, TK și ADN polimeraza, ambele codificate de HSV, sînt enzime care asigură eficiența și selectivitatea BVDU ca agent anti-HSV. Acest mecanism funcționează și în cazul altor virusuri : VZV, PRV, VSV, hepatitic bovin de tip 1.

În clinica umană, BVDU s-a arătat eficace în tratamentele locale și sistemice (administrare orală) ale diverselor infecții cu HSV-1 și VZV, ca : gingivostomatita herpetică, lupusul labial, keratita (keratoconjunctivita) herpetică, irita herpetică, encefalita herpetică, varicela-zoster, precum și în infecții mucocutanate cu HSV, infecții generalizate cu VZV la pacienții imunosupresați. Compusul nu a arătat toxicitate nici pentru măduvă, nici pentru ficat, rinichi sau alte organe. BVDU este susceptibilă unor ameliorări ale proprietăților privind creșterea aquosolubilității, facilitarea trecerii barierei hematoencefalice, diminuarea inducerii rezistenței, creșterea acțiunii în cazurile de stabilire a infecției latente.

Derivați 5-substituiți ai 2′-dezoxicitidinei (5-X-DC). *5-bromo-2′-dezoxicitidina (BrDC)* și *5-iodo-2′-dezoxicitidina (IDC)* au proprietăți antiherpetice mai selective și mai puțin toxice decît omologii lor uridinici, *in vitro* și la animale, cu o mare probabilitate de succes în tratarea unor infecții herpetice la om (keratite, encefalită). Acești compuși mai au avantajul unor mai bune aquosolubilități și stabilități precum și al unui mai mare timp de înjumătățire decît derivații uridinici corespunzători.

Spre deosebire de celulele neinfectate în care BrDC este dezaminată cu formare de BrDU, care este apoi fosforilată la BrDUMP, în celulele infectate se formează întîi BrDCMP care este apoi dezaminat la BrDUMP și ulterior fosforilat la BrDUDP și BrDUTP, formă care reprezintă un substrat al ADN polimerazei și poate fi încorporată în ADN. Acțiunea antivirală selectivă a BrDC și IDC se bazează pe afinitatea specifică mult mai mare pentru dezoxicitidinkinaza indusă de virus decît pentru cea celulară.

Problema principală întîmpinată de utilizarea la om a acestor compuși este toxicitatea lor ridicată datorită existenței, în țesuturile umane, a unei dezoxicitidinkinaze foarte active care-i transformă în omologii lor uridinici, ce apar, astfel, în concentrații toxice. S-a încercat, cu oarecare succes, suprimarea acestui efect toxic prin administrarea concomitentă a unor inhibitori ai acestei kinaze, ca, de exemplu, tetrahidrouridina.

1-β-D-ribofuranozil-1,2,4-triazol-3-carboxamidă (ribavirină ; Virazol). Ribavirina este socotită ca făcînd parte dintre analogii nucleozidici, partea neglucidică putînd fi considerată ca derivînd dintr-un nucleu purinic cu care păstrează anumite analogii (fig. 13—4 *A* și *B*).

Acest compus se distinge printr-o foarte largă paletă de virusuri ARN și ADN a căror replicare — *in vitro* — o poate inhiba : adeno, vaccinal, citomegalic murin, herpes simplex tip 1 și 2, gripal și paragripal, rhino, Coxsackie, polio, al stomatitei veziculoase și Semliki Forest. Există o mare variație în privința naturii celulelor în care ribavirina este eficientă, precum și în privința concentrației minime active. Cele mai sensibile virusuri la acțiunea ribavirinei s-au dovedit ortho-, myxo- (gripal) și paramyxovirusurile (paragripal, rujeolic) și virusurile herpes simplex tip 1 și 2. Nu s-au decelat tulpini virale rezistente la acest medicament.

Largul spectru de virusuri afectate de ribavirină observate în testările *in vitro* s-a confirmat și în testările *in vivo*, preclinice. Dintre virusurile ADN, cele mai sensibile s-au arătat cele din familiile herpes și pox, urmînd papovavirusurile, cele mai puțin sensibile fiind virusurile adeno și parvo. Dintre virusurile ARN, ribavirina și-a arătat o bună eficiență asupra arena-, bunya-, corona-, ortho, myxo- și retrovirusurile și o eficiență slabă sau nulă asupra picorna-, rhabdo-, reo- și togavirusurilor.

Cele mai bune rezultate s-au obținut în infecțiile experimentale gripale și paragripale *in vivo*, în care ribavirina a fost administrată fie oral, fie intraperitoneal, subcutanat sau prin aerosoli, în special în schemele profilactice. Astfel, ribavirina a fost eficientă în hepatita murină (tip B) acută, dar nu în afecțiunile cronice, în infecțiile mucocutanate cu virus herpes tip 1 sau 2, în infecțiile cu virusul febrei hemoragice și cel al leucemiei murine.

Cercetările asupra folosirii ribavirinei în virozele umane au dat, pînă în prezent, cele mai bune rezultate în infecțiile gripale, herpetice și hepatitice.

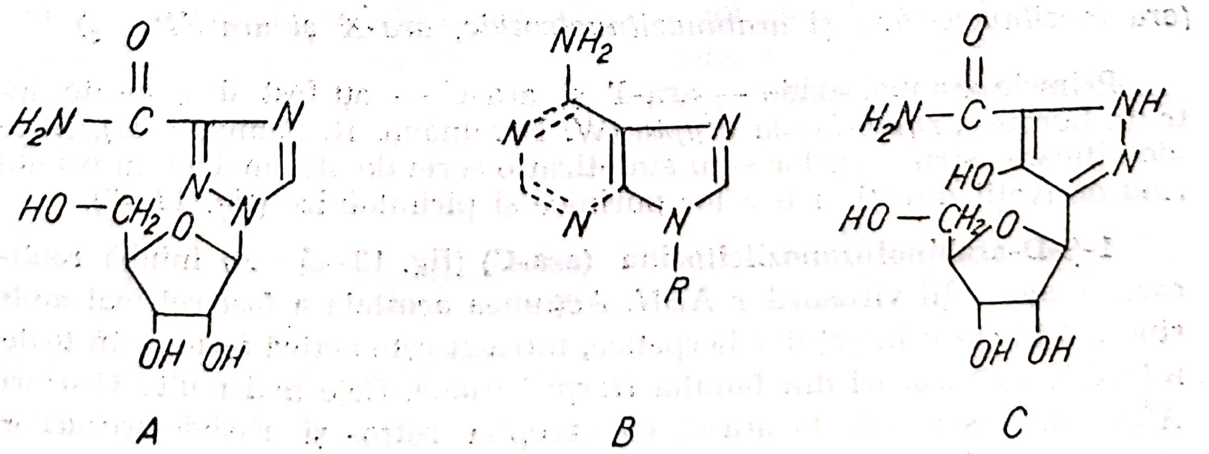


Fig. 13-4 — *A* — ribavirina ; *B* — nucleu purinic (partea nepunctată este cea analoagă cu nucleele azotate ale *A* și *C*) ; *C* — pirazofurina.

În infecțiile gripale s-au obținut rezultate contradictorii — unele foarte bune, altele îndoielnice — în urma folosirii unor tulpini diferite, precum și a unor doze și administrări neunitare. Comparativ, eficiența ribavirinei a fost mai modestă în infecțiile cu virusuri gripale de tip B.

Hepatita acută de tip A a fost tratată cu succes în mai multe experimente făcute cu controale riguroase (placebo, dublu orb). Tratamentul cu ribavirină în hepatitele cronice de tip B nu a fost eficient.

În infecțiile herpetice cele mai bune rezultate s-au obținut în formele cutanate (administrare sistemică și locală) cu localizare genitală și orală.

Acțiunea antivirală a ribavirinei se datorează, după majoritatea datelor, micșorării rezervelor celulare de GTP și dGTP, ca urmare a inhibării inozin-5′-monofosfatdehidrogenazei — enzimă-cheie în metabolismul GMP — și, în consecință, a limitării sintezei de xantozinmonofosfat, precursor al GMP. Condiția necesară pentru ca ribavirina să îndeplinească acest rol inhibitor este fosforilarea sa pînă la stadiul de trifosfat, adenozinkinaza celulară fiind cea care catalizează prima treaptă de fosforilare.

Plecîndu-se de la ribavirină, s-au sintetizat o serie de derivați la nivelul ciclului triazolic. Este interesant de menționat că derivatul 1, 4, 5-triazolic este un foarte bun inhibitor al IMP dehidrogenazei, dar total inactiv ca agent antiviral, pe cînd derivatul carboxiamidinic este un slab inhibitor al acestei enzime, dar un excelent agent antiviral.

3-β-D-ribofuranozil-1-4-hidroxipirazol-5-carboxamida (pirazomicina; pirazofurina) este socotită, ca și ribavirina, un analog nucleozidic prin transformarea restului neglucidic (vezi fig. 13—4 *C*). *In vitro* este activă asupra mai multor virusuri, atît ARN cît și ADN, cum sînt virusurile stomatitei veziculoase, rujeolic, polio, Sindbis și al leucemiei Gross, la concentrații foarte scăzute. Studiile *in vivo* au arătat că pirazofurina exercită o acțiune de protecție împotriva infecțiilor cu virusurile vaccinal și leucemic murin.

Ca și ribavirina, pirazofurina este convertită în derivatul monofosforilat care interferează cu sinteza UTP la nivelul decarboxilazei acidului orotidilic.

13.2.1.2. *Analogi nucleozidici prin modificări în nucleul glucidic (arabinozilnucleozide și arabinozilnucleotide, ara-X și ara-*XP_{1-3})

Primele aranucleozide — ara-T și ara-U — au fost descoperite într-un burete, *Cryptothetya crypta* (W. Bergmann, R. Fenny, 1951). După identificarea structurii lor s-au sintetizat o serie de alți analogi, în primul rînd derivații direcți ai bazelor purinice și pirimidinice (fig. 13—5).

1-β-D-arabinofuranozilcitozina (ara-C) (fig. 13—5 *A*) inhibă replicarea majorității virusurilor ADN. Acțiunea acesteia a fost cel mai mult studiată în cazul infecțiilor herpetice, întrucît este activă *in vitro* în toate infecțiile cu virusuri din familia *Herpesviridae*. Cele mai multe virusuri ARN sînt insensibile la ara-C, cu excepția retro- și rhabdovirusurilor (tabelul 13—V). Pentru a-și exercita toxicitatea, ara-C trebuie să fie transformată în nucleotidul corespunzător — araCMP — prin fosforilare

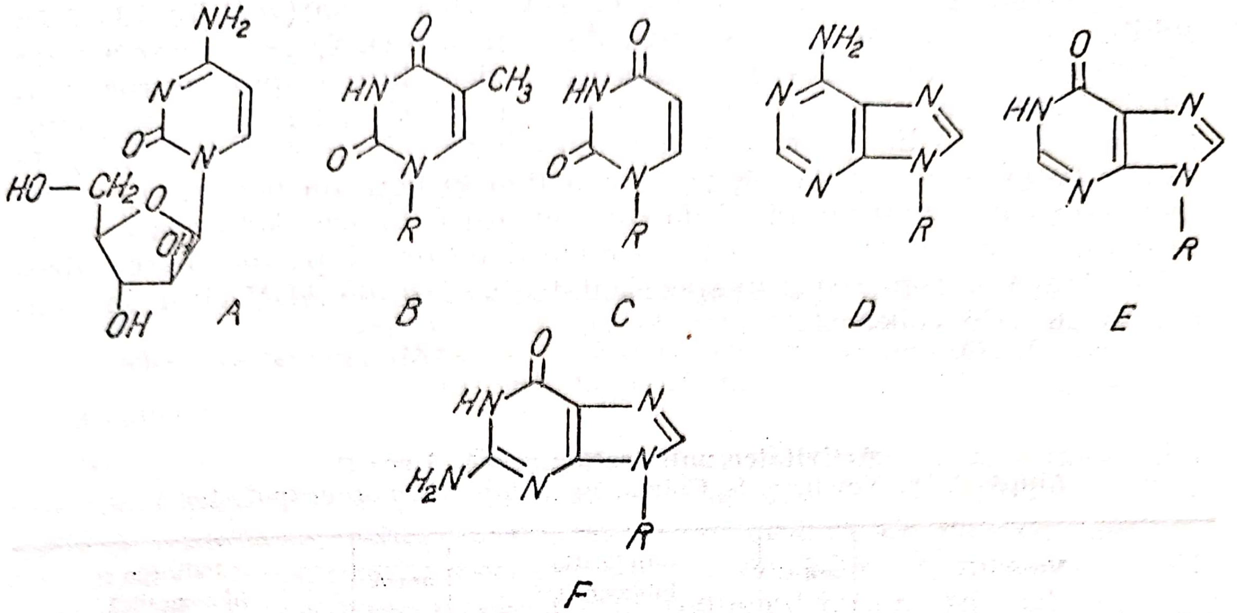

NH2
N
O
N
HO—CH2
O
OH
OH
A
O
HN
CH3
O
N
R
B
O
HN
O
N
R
C
NH2
N
N
N
N
R
D
O
HN
N
N
N
R
E
O
HN
N
H2N
N
N
R
F

Fig. 13-5 — Principalele arabinozilnucleozide.
A — ara-C ; *B* — ara-T ; *C* — ara-U ; *D* — ara-A ; *E* — ara-Hx (hipoxantina) ; *F* — ara-G ; *R* — arabinoză.

de către dezoxicitidinkinază (Cohen, 1976). Celulele care nu au această enzimă sînt rezistente la acțiunea toxică a ara-C. Nucleotidul este apoi fosforilat, cu formare de araCDP și araCTP, de către dCMP kinaza și, respectiv, nucleoziddifosfokinaza (fig. 13—6). O însemnată parte a ara-C este dezaminată — prin acțiunea citidindezaminazei — cu formare de ara-U care se elimină prin urină. Această transformare scade eficacitatea ara-C, întrucît ara-U este mai puțin activă și rapid excretată. Eficacitatea ara-C este mult refăcută prin administrarea ei împreună cu tetrahidrouridina, un inhibitor puternic al enzimei, sau cu un compus ce duce la consumul de dCTP celular (timidină, 2′-dezoxiadenină ș.a.). Activitatea ara-C pare a se datora atît acțiunii inhibitoare asupra sintezei ADN viral, cît și a încorporării araCTP în acest ADN. Totuși, detaliile mecanismului prin care ara-C inhibă sinteza ADN-HSV nu sînt pe deplin descifrate. De asemenea, lipsește o explicație clară a slabei sale acțiuni *in vivo*. Acest fapt, alături de toxicitatea ridicată, au împiedicat folosirea ara-C în clinica umană.

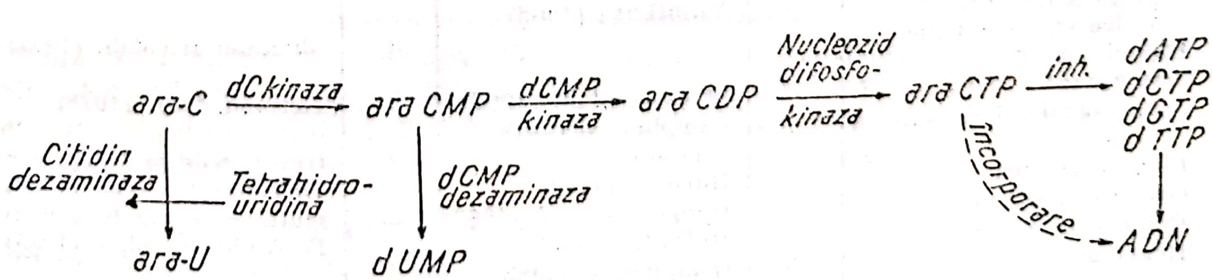

ara-C
dC kinaza
ara CMP
dCMP
kinaza
ara CDP
Nucleozid
difosfo-
kinaza
ara CTP
inh.
dATP
dCTP
dGTP
dTTP
Citidin
dezaminaza
Tetrahidro-
uridina
dCMP
dezaminaza
încorporare
ADN
ara-U
dUMP

Fig. 13-6 — Metabolismul ara-C în celulele mamiferelor.

9-β-D-arabinofuranoziladenina (ara-A ; vidarabina) (vezi fig. 13—5 *D*) inhibă replicarea unui larg spectru de virusuri ADN, precum şi a unor virusuri ARN (tabelul 13-V). Acţionează cu deosebire asupra tuturor virusurilor herpetice umane : herpes simplex tip 1 şi 2, herpes zoster, citomegalic, Epstein-Barr, precum şi asupra unor poxvirusuri (vaccinal). În testele pe animale, ara-A s-a dovedit activă în keratita herpetică experimentală şi în leziuni ale pielii, la concentraţii netoxice. Acţiunea maximă se obţine la administrarea sa în primele două ore după inocularea virusului. Ara-A se remarcă prin specificitatea sa faţă de ADN viral, în comparaţie cu ADN celular (58% vs. 20%).

TABELUL 13-V

Activitatea antivirală a ara-A şi ara-C
(după T. W. North, S. S. Cohen, în „*Viral Chemotherapy*“, 1984)

Virus	ara-C	Indicaţie bibliografică	ara-A	Indicaţie bibliografică
Virusuri ADN				
Herpesvirusuri				
v. herpes simplex 1	+	Underwood (1962)	+	P. de Garilhe şi colab. (1964)
v. herpes simplex 2	+	Fiala şi colab. (1972)	+	Person şi colab. (1970)
v. varicella-zoster	+	Rapp (1964)	+	Schabel (1968)
v. citomegalic	+	Sidwell şi colab. (1972)	+	Schabel (1968)
v. Epstein-Barr	?		+	Benz şi colab. (1978)
v. pseudorabic	+	Buthala (1964)	+	Sidwell şi colab. (1970)
v. herpes saimiri	+	Adamson şi colab. (1972)	+	Adamson şi colab. (1972)
v. herpes simian	—		+	Schabel (1968)
Poxvirusuri				
v. vaccinal	+	Renis, Johnson (1962)	+	P. de Garilhe şi colab. (1964)
swinepoxvirus	+	Buthala (1964)		
fowlpoxvirus	+	Buthala (1964)		
v. mixomatozei			+	Sidwell şi colab. 1970)
Papovavirusuri				
SV40	+	Butel, Rapp 1966)		
v. polyoma			±	Freeman şi colab. (1970)
Adenovirusuri	±	Feldman, Rapp (1966)	±	Schabel (1968)
Virusuri ARN				
Retrovirusuri				
v. sarcomului Rous	+	Bader (1965)	+	Schabel (1968)
v. sarcomului murin	+	Hirschmann (1968)	—	
v. leucemiei Friend	+	Yoshikura (1968)		
v. leucemiei murine			+	Shannon şi colab. (1964)
Rhabdovirusuri				
v. rabic	+	Maes şi colab. (1967)	+	Hermon, Janis (1978)
v. stomatitei veziculoase	+	Campbell şi colab. (1968)	+	Grant, Sabina (1972)
Picornavirusuri	—	Buthala (1964)	—	De Rudder şi colab. (1964)
Orhomyxovirusuri	—	Renis, Johnson (1962)	—	Huffman şi colab. (1963)
Paramyxovirusuri	—	Buthala (1964)	—	De Rudder şi colab. (1965)
Reovirusuri	—	Campbell şi colab. (1968)	—	Shannon (1977)

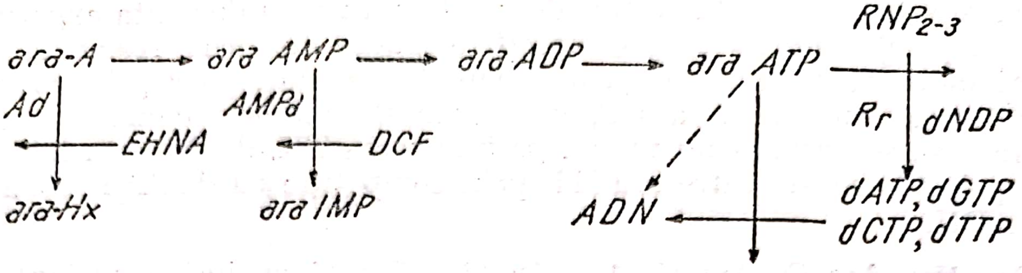


Fig. 13-7 — Metabolismul ara-A în celulele mamiferelor (după D. Shugar). *Ad* — adenozindezaminaza ; *AMPd* — AMPdezaminaza ; *Rr* — ribonucleotidreductaza ; RNP_{2-3}— ribonucleotiddi-trifosforilat ; *dNDP* — deoxinucleotiddifosforilat.

Ara-A acţionează ca inhibitor specific al ADN viral după o prealabilă fosforilare pînă la araATP, pe trei căi (fig. 13—7) : *1*) inhibarea ribonucleotidreductazei, reducînd concentraţia celulară de dezoxiribonucleotizi şi, deci, a compuşilor necesari sintezei de ADN ; *2)* inhibarea ADN polimerazei, cu precădere a celei virale, reducînd biosinteza ADN, în special al celui viral ; 3) încorporarea araAMP, dar, mai ales, a araATP în catenele de ADN, în special al celui viral. Eficacitatea ara-A este notabil micşorată prin dezaminare, fie ca atare de către adenozindezaminază, cu transformarea adeninei în hipoxantină (Hx), fie prin dezaminarea araAMP de către AMP dezaminaza, cu transformarea AMP în inozinmonofosfat (IMP). Acest dezavantaj poate fi prevenit prin asocierea unor inhibitori ai dezaminazelor amintite, cum sînt unii compuşi cu structuri de analogi nucleozidici ca, de exemplu, eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)-adenină (EHNA), inhibitor al adenindezaminazei şi 2′-dezoxicoformicin (DCF), inhibitor al AMP dezaminazei. Astfel, creşterea activităţii antivirale a ara-A, ca urmare a asocierii cu DCF, în cazul infecţiilor herpetice experimentale la şoareci, este cu un ordin de mărime, la fel ca şi în cazul infecţiilor corneene experimentale la iepuri. În mod asemănător, creşte activitatea ara-A şi în urma asocierii cu EHNA. Aceste rezultate (şi altele similare) deschid largi perspective terapiei antiherpetice cu ara-A, avînd în vedere scăzuta sa solubilitate (ceea ce, de exemplu, reclamă mari volume de lichid în tratamentele sistemice, ridicînd o serie de probleme de altă natură) şi rapida sa inactivare prin dezaminare.

9-β-D-arabinofuranoziladeninmonofosfat (ara AMP) (vezi fig. 13-7), a cărui sinteză este necesară pentru ca ara-A să poată acţiona, merită o menţionare specială avînd în vedere marea sa solubilitate în raport cu cea a ara-A şi avantajele create astfel, importante pentru clinica umană. În plus, araAMP pătrunde uşor în celulele intacte unde poate servi şi ca formă de depozitare a ara-A. O importanţă particulară o prezintă, mai ales, timpul său de înjumătăţire, la om, care depăşeşte 24 de ore. Toate aceste avantaje, alături de asocierea cu inhibitori ai dezaminazelor fac din araAMP un medicament antiviral de mare perspectivă.

1-β-D-arabinoziltimina (ara-T) (vezi fig. 13—5 *B*) a fost descoperită împreună cu ara-U ca produşi naturali ai unor spongier (1951). *In vitro* este relativ netoxic (timidinkinaza celulară nu o poate fosforila). Totuşi, inhibă replicarea HSV în culturi de celule și *in vivo* (keratita experimentală la iepuri), datorită kinazei specifice induse de virus. Avînd un timp de înjumătățire mic, eficiența sa poate fi crescută doar prin asocierea cu derivatul metilat al ara-C, care prin dezaminare generează ara-T. Acțiunea sa se bazează nu numai pe inducerea TK, dar și prin inhibarea ADN polimerazei de către araTTP prin competiție cu dTTP necesar sintezei ADN.

Ara-Hx, Ara-G, Ara-U. *Ara-Hx (9-β-D-arabinozilhipoxantina)* (vezi fig. 13—5 *E*), formată prin dezaminarea ara-A este slab toxică și activă împotriva HSV și virusului vaccinal. Este mult mai puțin activă decît ara-A.

Ara-G (9-β-D-arabinozilguanina) (vezi fig. 13—5 *F*) inhibă replicarea HSV și a virusului vaccinal *in vitro* și *in vivo* (keratite la iepuri și infecții intracerebrale la șoareci). Are dezavantajul unui prea mic timp de înjumătățire (45 min). Rezultate ceva mai bune s-au obținut cu araGMP.

Ara-U (1-β-D-arabinoziluracil) (vezi fig. 13—5 *C*), formată *in vivo* prin dezaminarea enzimatică a ara-C, este slab activă și se elimină relativ rapid.

9-[(2-hidroxietoxi)-metil]-guanina (acicloguanozina ; aciclovir ; Zovirax) (fig. 13—8) este socotită — datorită valorii superioare a indexului său terapeutic, precum și a spectrului larg al indicațiilor clinice — ca un agent antiviral din a treia generație, comparativ cu cele din primele două generații reprezentate de IDU și, respectiv, de ara-A. Acicloguanozina (ACG) se distinge printr-o deosebită acțiune antivirală combinată, practic, cu lipsa de toxicitate celulară. Este activă, *in vitro*, împotriva virusurilor (în ordine descrescîndă) : HSV tip 1 și tip 2, varicella-zoster, Epstein-Barr, citomegalic. Nu este activă împotriva virusurilor ARN. Are cel mai scăzut CI$_{50}$ (concentrație inhibitoare 50%) în comparație cu alți agenți antivirali. De exemplu, în cazul celulelor Vero infectate cu HSV-1, CI$_{50}$ este 0,1 μM (IT*=2 000) față de 0,2 μM (ara-C), 1,0 μM (IDU) sau 16 μM (ara-A). În testele făcute pe animale, ACG administrată pe diferite căi s-a dovedit activă împotriva herpesului oral, cutanat, genital și diseminat (șoarece și cobai), ca și împotriva celui encefalitic (șoarece, hamster, iepure). De asemenea, administrată intravenos, este activă împotriva keratitei la iepuri și protejează împotriva encefalitei subsecvente acesteia. În clinica umană, ACG acționează cu bune rezultate împotriva infecțiilor herpetice recurente labiale, cutanate și genitale (inclusiv infecții primare). De asemenea, administrată pe care intravenoasă (în doze de 5 mg/kg/8 ore, prin perfuzii lente), ACG este activă în herpesul local și diseminat, în herpesul genital (transmisibil pe cale sexuală), ca și în infecțiile cu VZV. O mențiune specială trebuie făcută în privința eficacității ACG la pacienții imunocompromiși, mai ales în perioadele imediat următoare transplanturilor, la care riscul infecțiilor, inclusiv al celor virale, este foarte mare, atît în privința frecvenței, cît și a intensității.

---

* *IT*=index terapeutic (chimioterapeutic, de selectivitate) ; reprezintă raportul numeric dintre valorile concentrației maxime tolerate (CMT) și concentrației minime inhibitoare (CMinh).

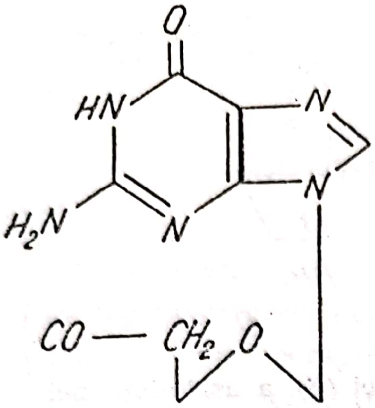


Fig. 13-8 — Formula acicloguanozinei (aciclovir ; Zovirax).

Administrată sub această formă, în special, ACG previne reactivarea virusului latent (fără să fie, încă, clar că influențează virusul *in situ),* nu induce rezistență, se elimină pe cale renală fără a afecta funcția renală, este netoxică chiar la pacienții imunocompromiși.

Deosebita specificitate a ACG se bazează pe două proprietăți fundamentale, oglindite în mecanismul său de acțiune. Prima este rezistența sa la acțiunea timidinkinazei din celula-gazdă, respectiv fosforilarea sa la stadiul de ACG-MP numai de către TK indusă de virus. Fosforilarea ulterioară pînă la stadiul de ACG-TP — absolut necesară, căci numai sub această formă ACG poate acționa ca agent antiviral — se face cu ajutorul TK a celulelor-gazdă. Astfel, ACG are marea calitate de a nu fi toxică deoarece este activată numai de către celulele infectate. Infecțiile cauzate de virusurile Epstein-Barr și citomegalic pot fi inhibate *in vitro* doar de concentrații foarte apropiate de limita toxicității (50—100 μM), întrucît ele nu codifică TK. O dovadă o constituie faptul că mutantele *TK*+ și virusul vaccinal care nu induc formarea de TK nu sînt inhibate de ACG. Slaba acțiune care se constată, totuși, uneori, în asemenea infecții poate fi pusă pe seama altor eventuale enzime fosforilante sau pe seama unui mecanism în care ținta ACG ar fi o altă enzimă ca, de exemplu, o ribonucleotidreductază. A doua proprietate care-i conferă înalta sa specificitate o constituie faptul că ACG-TP este un inhibitor al ADN polimerazei virale la concentrații net inferioare celor necesare pentru inhibarea enzimei omoloage celulare. Aceasta se referă nu numai la HSV și VZV, ci și la EBV și CMV. Și în aceste cazuri, celulele mutante la nivelul genelor pentru ADN polimerază sînt rezistente la acțiunea ACG. O dovadă suplimentară pentru explicațiile inducerii rezistenței prin mutații la nivelul genelor TK și ADN polimerazei o constituie abolirea rezistenței în cazurile cultivării virusurilor în celule transformate biochimic, capabile să exprime TK sau ADN polimeraze virale.

Deși problema inabilității ACG de a eradica infecțiile lente cu HSV și VZV își așteaptă încă soluția, acest compus, intrat deja pe piața internațională, constituie unul din medicamentele antivirale cele mai eficace cunoscute pînă în prezent.

(S)-9-(2,3-dihidroxipropil)-adenina [(S)-DHPA] (fig. 13—9 A) este activă împotriva unor virusuri atît ADN cît și ARN, ca : herpes simplex, vaccinal, rujeolic și al stomatitei veziculoase. Este un inhibitor al adenindezaminazei, dar mecanismul de acțiune nu este, încă, pe deplin înțeles.

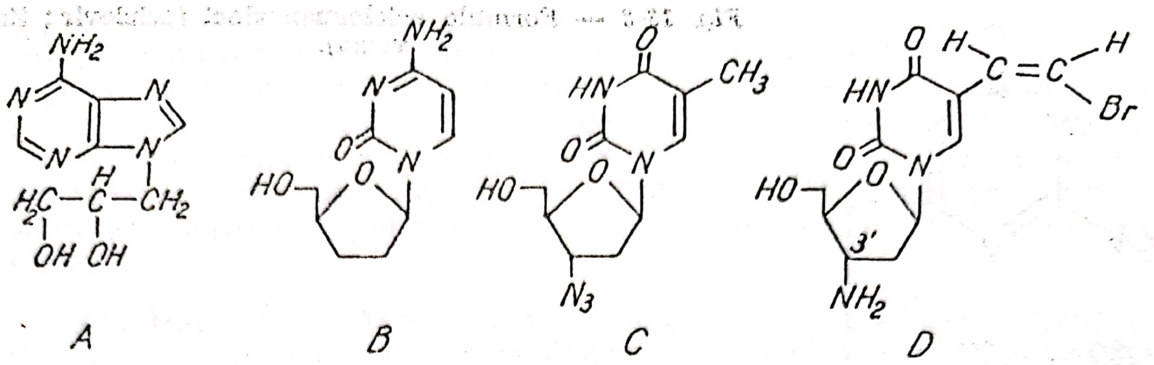


Fig. 13-9 — Formula (S)-DHPA *(A)*, a didezoxicitidinei *(B)*, a azidotimidinei *(C)*, a 3-NH_2-BVDU *(D)*.

Un interesant efect de sinergism se obține în testul reducerii plajelor prin difuzie în agar, cînd (S)-DHPA încorporată în agar într-o concentrație subinhibitoare (100 µg/mL) exercită împreună cu ara-U (500 mg/mL) un puternic efect inhibitor, care-l depășește pe al ara-C. S-au sintetizat un grup de analogi ai DHPA, modificați atît la nivelul bazei, cît și al catenei alifatice. Deși unii sînt activi, nici unul nu a depășit puterea inhibitoare a DHPA.

S-au sintetizat derivați de la ACG dintre care merită a fi menționați : *hidroximetilderivatul (DHPG) și dihidroxibutilguanina (DHBG)*. Se speră ca acești compuși să fie utili în infecțiile cu virusul citomegalic la imunocompromiși, mai ales prin efectul de sinergism ce se obține prin asocierea DHPG cu fosfonoformatul, efect absent în cazul ACG.

Didezoxinucleotidele alcătuiesc un grup recent de analogi din această clasă. Cei mai reprezentativi compuși sînt : *didezoxicitidina* (vezi fig. 13—9 *B*), *azidotimidina* (AZT) (vezi fig. 13—9 *C*) și *3-NH_2-BVDU* (vezi fig. 13—9 *D*). Toți acești compuși se caracterizează chimic fie prin lipsa oxidrililor din pozițiile 2′ și 3′, fie prin înlocuirea unui atom de H din poziția 3′ printr-o grupare NH_2 (3-NH_2-BVDU) sau N_3 (AZT). Inexistența OH în poziția 3′ sau înlocuirea lui cu o grupare care nu permite formarea legăturii 3′—5′ internucleotidice blochează la acest nivel lungirea catenei polinucleotidice și, deci, a replicării genomului viral. Acești compuși nu se integrează în ADN celular, ci numai în genomul ADN viral, fiind specifici și selectivi.

Cel mai reprezentativ și de perspectivă compus al acestui grup este, pînă în prezent, AZT. El acționează ca inhibitor viral și pe altă cale, a inhibării reverstranscriptazei (RT) virale. După activarea sa printr-o triplă fosforilare de către kinazele celulare el se leagă de RT — pentru care are o afinitate de 100 de ori mai mare decît pentru ADN polimerazele celulare — și este încorporat în ADN, după care, datorită grupării N_3, blochează sinteza ADN.

Efectul antiviral are loc la o concentrație mult scăzută sub nivelul celei care afectează funcțiile imune ale celulelor T. Testele clinice făcute pe loturi de bolnavi de SIDA sau afectați de complexul de simptome legate de infecția cu virusul HIV au arătat că AZT reduce semnificativ morbiditatea, diminuează infecțiile secundare și determină o creștere în greutate, precum și o refacere a funcției imune.

Se speră, pe baza unor teste *in vitro*, ca performanțele anti-HIV ale AZT să fie crescute prin asociere cu interferon α sau cu unele proteine cu capacități de reglare a sistemului imun. Asocierea cu ribavirină scade eficacitatea AZT prin competiționare pentru situsurile active ale enzimelor care fosforilează AZT.

Toți compușii care alcătuiesc acest grup reprezintă o nouă generație de analogi, de mare perspectivă, de la care se așteaptă succese în combaterea unor boli virale dintre cele mai grave, așa cum sînt HIV, herpesul ș.a. (eficiență, lipsă de toxicitate, selectivitate ș.a.).

13.2.1.3. *Nucleozide pirimidinice*

Această clasă de analogi pirimidinici sînt, de fapt, derivați de la triazine. Asemănarea cu bazele pe care le mimează este atît de mare, încît pot fi fosforilate de kinazele specifice acestora (de exemplu, 6-azauridina).

6-Azauridina, triazină ribozilată, este reprezentantul cel mai activ al acestui grup. Spectrul său antiviral este foarte larg (tabelul 13—VI).

Dintre virusurile menționate în tabelul 13—VI, doar în foarte puține cazuri s-a depășit faza testărilor *in vitro*. Este vorba de virusurile vaccinal, herpetic și variolic.

TABELUL 13-VI

Spectrul antiviral al 6-azauridinei
(după Rada-Doskocil, 1984)

Virusuri inhibate	Virusuri neinhibate
V. Denga 2	V. herpetic porcin
V. limfocitozei coriomeningiene	V. gripal A, A1, B1
V. REO 3	V. bolii Newcastle*
V. adeno 5	V. stomatitei veziculoase
V. polyoma	V. encefalomielitei vestice
V. rujeolic	V. Sindbis
V. mozaicului galben al napului	V. Semliki Forest
Fowl plague virus	V. Mengo
V. encefalomielitei ecvine venezuelene	
V. sarcomului Rous	
V. vaccinal	
V. ECHO 7	
V. encefalitei japoneze	
V. paragripal 3	
V. citomegalic	
V. herpetic uman	

* Cîteva tulpini arată o sensibilitate parțială.

Infecția experimentală la iepuri cu dermovaccină a putut fi combătută cu 2 doze zilnice de cîte 300 mg/kg timp de trei zile, fără efecte secundare negative importante. Ridică probleme excreția renală prea rapidă. La om, această doză (180—270 mg/kg), aplicată de 3 ori pe zi, nu a dat rezultate. Rezultate satisfăcătoare s-au obținut în cazul infecțiilor herpetice. În keratitele experimentale la iepuri s-au obținut vindecări prin administrare repetată de picături ce conțineau drogul în concentrație de 0,75—1%, atît atunci cînd s-a început tratamentul odată cu apariția primelor simptome, cît și în cazurile începerii acestuia la 7 zile postinfecție. La om s-au obținut vindecări într-o proporție semnificativă prin tratare cu triacetat de 6-azauridină, timp de 3—21 de zile (98—118 g). Studii de toxicitate pe termen lung au arătat că aceasta este scăzută la adulți iar folosirea unor doze prea mari de către gravide poate provoca efecte teratogene. La animale, efectele imunodepresive sînt scăzute pînă la medii. Nu se obțin efecte mutagene. 6-Azauridina acționează *in vivo* numai după transformarea sa în derivatul monofosforilat, de către uridinkinază. Aceasta este un inhibitor al decarboxilazei acidului orotidilic, care generează uridina necesară sintezelor de ADN și ARN. Derivații di- și trifosforilați sînt și ei activi, ca inhibitori ai polimerazelor, dar nu prin încorporare în acizii nucleici.

Este de menționat că rezultate bune la animale și oameni s-au obținut în cazurile de variolă. Eradicarea bolii însă a îndepărtat atenția de la aceste cercetări.

Alți derivați. Studii ale relațiilor structură-funcție au arătat că, în general, 6-azauridina diminuează semnificativ calitățile antivirale prin modificări structurale, fie la nivelul ciclului pirimidinic, fie la cel al componentei glucidice. Într-o serie de N-metil-, tio- și metilmercaptoderivați, numai trei s-au arătat mai activi decît 6-azauridina : *3-metil-2,4-ditio-6-azauracil* și *3-metil-2-metilmercapto-4-tio-6-azauracil.* Perspectivele folosirii lor depind de posibilitatea scăderii toxicității sau a dozei prin efecte sinergice.

5-Azacitidina a fost studiată ca agent antiviral pornindu-se de la proprietățile sale mutagene. Ea poate afecta expresia genică prin hipometilare, fiind astfel folosită ca tehnică modernă în citochimie și virologie. Datorită riscului provocării unei diferențieri celulare necontrolate, precum și a unei reactivări a reovirusurilor, valoarea sa terapeutică este foarte limitată. Datorită însă efectelor asupra fagilor este folosită, uneori, la studiul mecanismelor sale de acțiune, în eventualitatea găsirii de noi căi metabolice care pot servi drept ținte în chimioterapie.

Perspectivele folosirii acestor analogi în clinica umană, în pofida slabei acțiuni și a riscurilor prezentate sînt, totuși, destul de largi avînd în vedere *efectele de sinergism* ce pot fi obținute prin asociere cu alți analogi halogenați ai 2′-dezoxiU ai ara-A și ara-C, ai 6-mercaptopurinei, 6-tioguaninei, ametopterinei sau hidroxiureei. Se poate ajunge la scăderea concentrației ambilor inhibitori, pentru același efect, de 1/16—1/128. Asocierea cu (S)-DHPA a dus la rezultate variabile în funcție de tipul de test și de celulele folosite.

13.2.1.4. *Analogi nucleozidici și nucleotidici prin schimbarea bazei și glucidului*

Acest al treilea grup de analogi nucleozidici și nucleotidici conține compuși cu structuri modificate, atît la nivelul bazelor, cît și la cel glucidic.

Cel mai reprezentativ compus este **5-metil-ara-C,** practic inactiv în celulele cu activitate dezaminazică scăzută. În celulele în care această enzimă este activă, compusul devine activ prin transformare enzimatică — fosfokinaze virale și celulare (vPK și, respectiv, cPK) — în 5-metil-ara-U, care este, de fapt, ara-T (menționat la grupul *b* de analogi) :

$$\underset{\text{(inactivă)}}{\text{5-metil-ara-C}} \xrightarrow{-NH_2} \text{5-metil-ara-U (ara-T)} \xrightarrow{vPK} \text{araTMP} \xrightarrow{cPK} \underset{\text{(activ)}}{\text{araTTP}}$$

Se poate considera, astfel, că **5-metil-ara-U** (ara-T) poate constitui rezerva celulară de ara-T. În lumina acestor proprietăți, o strategie adecvată pentru obținerea unor compuși mai eficienți ar putea fi sinteza unor derivați care ar putea fi substraturi atît pentru kinaze (pentru a fi transformați în polifosfați), cît și pentru citidindezaminaze.

Derivații etilați ca, de exemplu, **5-etil-ara-U** — produs al dezaminării 5-etil-ara-C — s-au arătat activi împotriva HSV-1 (tulpina KOS) în testări în celule de rinichi de iepure și pe fibroblaste de piele de hamster :

$$\text{5-etil-ara-C} \xrightarrow[\text{gazdă}]{-NH_2} \text{5-etil-ara-U} \xrightarrow{vPK} \underset{\text{(activ)}}{\text{5-etil-araUTP}}$$

Ca și în cazul precedent, 5-etil-ara-C poate juca rolul rezervei de 5-etil-ara-U, în celule cu dezaminaze active. Întrucît rata dezaminării scade cu lungimea catenei alchilice, eficacitatea acestor compuși scade în ordinea : ara-C>metil-ara-C>etil-ara-C, ultimul fiind de trei ori mai puțin activ decît ara-C. Cum specificitatea pentru HSV crește cu lungimea catenei alchilice, realizarea unui echilibru între aceste proprietăți ce variază în direcții opuse ar putea constitui o altă strategie în chimioterapia antivirală.

O altă familie de analogi o constituie compușii care au în loc de dezoxiriboză un rest 2′-dezoxi-2′-fluoroarabinozic legat de o bază purinică sau pirimidinică halogenată în poziția 5. Cel mai important reprezentant al acestei familii este derivatul citozinic **2′-fluoro-dezoxi-5-iodoarabinofuranozilcitozina (FIAC).** Este un bun inhibitor al HSV-1, *in vitro* (celule Vero, concentrație 100 μg/mL), mai eficient decît derivatul bromurat și de 100—1 000 de ori mai eficient decît ara-A. La concentrațiile inhibitoare pentru virus, nu sînt toxice pentru celula normală, dar sînt toxice pentru mai multe celule tumorale umane.

5′-amino-2′-didezoxi-5-iodouridina (AIU) este, *in vitro,* mai puțin toxică decît IDU. Acțiunea sa anti-HSV-1 se datorează faptului că ea constituie un substrat specific pentru TK indusă de virus. Mai este activă și împotriva HSV-2, dar nu și împotriva VZV. Efectul său, *in vivo,* administrat parenteral la șoarece sau local la cobai este limitat datorită rapidei sale metabolizări, iar administrată intraperitoneal la șoareci și șobolani este toxică.

Tot în această familie de analogi poate fi inclusă și **2-dezoxi-D-glucoza,** care inhibă HSV prin blocarea anvelopei virale. Acest efect are la bază inhibarea sintezei — stimulată de infecția herpetică — sfingolipidelor și hexozidelor, precum și interferarea cu procesul de glicozilare a ceramidelor endogene.

13.2.1.5. *Fosfonații*

Compușii din această clasă pot fi considerați ca fiind analogi ai pirofosfatului (fig. 13—10 *A*).

În alegerea acestor compuși și ai derivaților lor pentru testări ale proprietăților antivirale s-a plecat de la faptul că în timpul formării legăturii 3′-5′-internucleotidice în procesul biosintezei nucleice, nucleozidtrifosfații sînt hidrolizați de către polimeraze și elimină restul pirofosfatic (PP_i), ceea ce presupune existența la nivelul acestor enzime a unui loc de legare specifică a PP_i care ar putea conține elemente virus-specifice. Dintre analogii testați, cele mai bune rezultate s-au obținut cu derivații acetic (AFA) și formic (AFF) și, respectiv, ai sărurilor lor de sodiu.

Acidul fosfonoacetic (AFA) (vezi fig. 13—10 *B*) inhibă toate virusurile herpetice în culturi tisulare și în infecțiile experimentale la animale (șoarece, iepure), precum și două poxvirusuri, care sînt însă mai puțin sensibile decît cele herpetice (tabelul 13—VII).

În intervalul de concentrații 25—100 µM/mL, în care este un inhibitor eficient al replicării virale, AFA nu are efecte toxice asupra celulelor neinfectate, în culturi de celule umane (Wi-38), de fibroblaste de embrion de rață și de celule limfoblastoide purtătoare de virus Epstein-Barr intragenomic. AFA devine citotoxic la concentrații superioare — 200—1 000 µg/mL — cînd sînt inhibate și creșterea celulară și sinteza ADN.

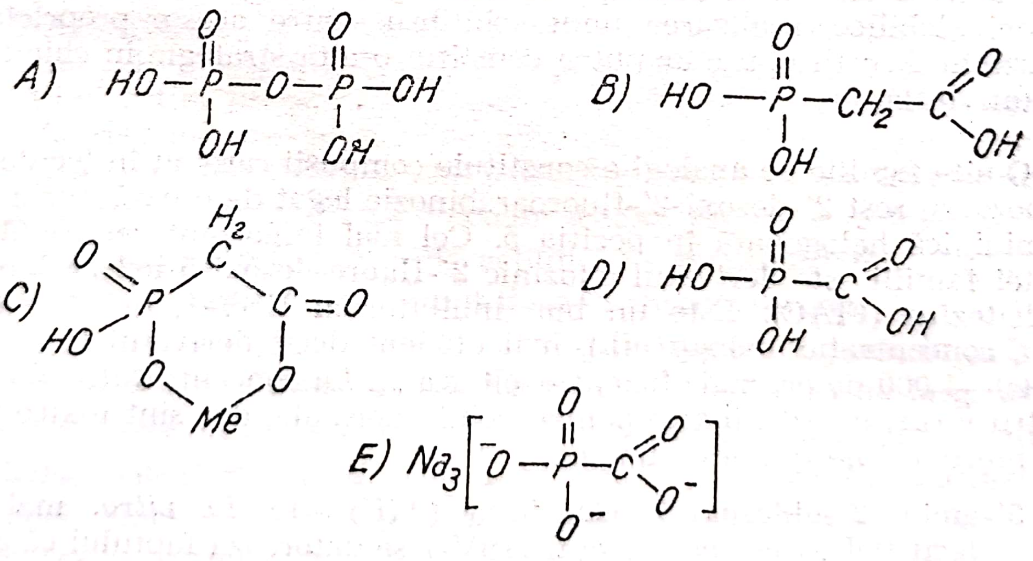


Fig. 13-10 — Formulele acidului pirofosforic *(A)*, fosfonoacetic (AFA) *(B)*, a complexului de chelare a AFA cu metale (Me) *(C)*, a acidului fosfonoformic (AFF) *(D)* și a sării lui trisodice *(E)*.

TABELUL 13-VI

Acțiunea inhibitoare a AFA asupra virusurilor în culturi celulare și la animale
(B. Öberg, în „*Problems of Antiviral Therapy*", 1983)

Virusuri	Indicații bibliografice
Herpesviridae	
v. herpes simplex 1 și 2	Shipkovitz și colab. (1973) ; Kern și colab. (1977) ; Overby și colab. (1977)
v. citomegalic (uman, simian, murin)	Huang (1975) ; Huang și colab. (1976) ; Overby și colab. (1976) —
v. Epstein-Barr	Nyormoi și colab. (1976) ; Yajima și colab. (1976) ; Summers-Klein (1976)
v. abortiv ecvin	Overby și colab. (1976)
v. herpes al curcanului	Lee și colab. (1976)
v. herpes saimiri	Huang și colab. (1976) ; Barahona și colab. (1977) ; Pearson-Benecke (1977)
v. bolii Marek	Lee și colab. (1976)
v. herpes al bufniței	Lee și colab. (1976)
v. varicella-zoster (uman)	Overby și colab. (1977) ; May și colab. (1977) ; Kern și colab. (1977)
v. pseudorabic	Hay și colab. (1977)
v. mieloopticoneuropatic acut	Nishiba-Inouie (1978)
v. febrei porcine africane	Moreno și colab. (1978)
Poxviridae	
v. vaccinal	Friedman-Kien și colab. (1976)
v. fibromului Shope	Friedman-Kien și colab. (1976)
Virusuri rezistente	
v. simian 40	Overby și colab. (1977)
v. adeno 12	Overby și colab. (1977)
v. polio	Overby și colab. (1977)
v. rhino	Overby și colab. (1977)
v. rujeolic	Overby și colab. (1977)

Cele mai bune rezultate terapeutice s-au obținut în cazurile de keratite și irite stabilite, la iepuri, prin aplicații locale de soluții 5% de AFANa$_2$ sau injecții intravenoase. Nefiind toxic, atunci cînd este supus testărilor în clinica umană, s-a dovedit eficient în cazurile de keratită, mai ales în cele rezistente la IDU. Nu a dat rezultate interesante ca agent profilactic.

Dintre analogii esterici ai AFA, numai cei cu greutate moleculară mică au arătat o anume activitate asupra polimerazei induse de HSV.

AFA acționează ca inhibitor, pe două căi : *1)* ca și pirofosfatul anorganic (PP$_i$) se leagă de situsurile de legare ale PP$_i$ din ADN polimeraze virus-induse. Interacțiunea este de tip necompetitiv relativ la dUTP și la ADN, cînd concentrația dUTP este scăzută, și de tip incompetitiv, cînd aceasta este crescută. *2)* Formarea unui chelat (vezi fig. 13—10 *C*) cu ionii metalici — formînd cicluri de șase elemente — avînd în vedere că ADN polimerazele conțin Zn^{++} și au nevoie de ioni de Mg^{++} (cofactori). Prin aceleași mecanisme, AFA captează Ca^{++}, prin legare reversibilă de matrixul anorganic al oaselor. Din această cauză, deși nu se semnalează efecte adverse, în unele țări (de exemplu, S.U.A.) AFA a fost oprit vremelnic de la testări în clinica umană.

Acidul fosfonoformic (AFF) (vezi fig. 13—10 *D* și *E*) inhibă, pe lîngă ADN polimerazele induse de virusurile herpetice și ADN polimeraza virusului hepatitei B, transcriptazele virusurilor stomatitei veziculoase, gripal A, REO precum și unele reverstranscriptaze. AFF inhibă, de asemenea, polimeraza din unele pro- și eucariote, inclusiv ADN polimeraza α din celulele umane (tabelul 13—VIII), acestea fiind, însă, mult mai puțin sensibile decît ADN polimerazele virale.

TABELUL 13-VIII

Gradul, mecanismul și constantele de inhibare ale unor polimeraze virale și celulare de către acidul fosfonoformic (AFF)
(B. Öberg, în „*Problems of Antiviral Therapy*“, 1983)

Enzima	Inhibiție[1]	Tip de inhibiție[2]	Constante de inhibiție		
			K_i[3]	K_{ii}[4]	K_{is}[5]
ADN polimeraze					
HSV-1 (C 42)	0,4				
dNTP*		NC	0,4	0,4	0,8
matrice ADN		IC	0,4	0,4	25
V. herpes al curcanului	2,5				
dNTP		NC	—	1,1	0,9
matrice ADN		NC	—	2,6	2,3
CMV uman (Ad169)	0,4				
dNTP		NC	0,4	0,28	0,82
HSV	20				
dNTP		NC	7,2	—	—
E. coli	>500				
celulare (α)	500				
dNTP		NC	—	24	59
matrice ADN		NC	—	32	176
ARN polimeraze					
V. gripal**	30				
dNTP		NC	33	—	—
VSV	500				
REO	500				
Reverstranscriptaze					
V. mieloblastozei aviare	7				
dNTP		NC	16	—	—
matrice ADN		NC	9	—	—
$(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$***		NC	100	—	—
$(dC)_n \cdot (dG)_{12-18}$		NC	0,25	—	—

[1] Concentrație (M) = AFF ce induce 50% inhibiție.
[2] NC = necompetitiv și IC = incompetitiv.
[3] K_i = derivată din curbe Dixon.
[4] K_{ii} = derivată din panta curbei Lineawer-Burke.
[5] K_{is} = idem, valoarea intercepției abscisei.
* dNTP = dezoxinucleozidtrifosfat.
** Virus gripal Victoria 3/75x—47.
*** rC, dC = (ribo-, dezoxirib)citidina ; dG = (dezoxiribo)guanozina.

AFF este eficient în afecțiunile herpetice cutanate, prin aplicații locale, dar este mult mai puțin iritant decît AFA. Cele mai bune rezultate s-au obținut cu creme cu 3% AFF (doze de 18 µg AFF). AFF nu este iritant nici la doze mai mari. Se speră la rezultate bune și în alte forme de herpes. De asemenea, protejează total culturile de celule infectate persistent cu HIV (o doză de 680 µM, p.i.) (Nesteriuc și colab., 1987).

Mecanismele de acțiune asupra polimerazelor sînt similare cu ale AFA, numai că, în calitate de ligand, formează cu ionii metalici cicluri de cinci elemente. Este de menționat formarea de mutante virale rezistente atît față de AFA, cît și de AFF, ceea ce, alături de instabilitatea în soluții acide și de legarea reversibilă de matrixul osos, constituie factori ce au impus rezerve față de folosirea acestor medicamente în clinica umană.

O cale de perspectivă în terapia antiherpetică se pare că o reprezintă cuplarea unui fosfonat cu un oligonucleotid complementar cu secvența coezivă a pre-ARNm timpuriu 4 și 5 al HSV-1, cu care s-a obținut o inhibare de 90% a replicării virusului (75 µM, la 1—24 de ore după infecția experimentală) (1986). Rezultate pozitive au fost obținute și cu oligonucleotide complementare cu ARN viral sau ADN pro-viral (virusul uman limfotropic pentru celulele T de tip III) (1986).

13.2.2. AMANTADINA ȘI DERIVAȚII SĂI

Activitatea antivirală a *clorhidratului de amantadină (1-aminoadamantan)* (fig. 13—11 *A*) a fost semnalată pentru prima oară în 1963 (Jackson și colab.).

Acest compus inhibă, în culturi celulare, replicarea mai multor tulpini de virus gripal de tip A, a uneia de tip C și a virusului Sendai I (paramyxovirus). O anumită acțiune inhibitoare o exercită și asupra virusurilor rubeolic, pseudorabic, unor virusuri ARN oncogene, ca și asupra virusului coriomeningitei limfocitare. Principala sa importanță, ca și aceea a celui mai cunoscut derivat al său *rimantadina (clorhidrat de 1-metilaminometiladamantan)* — folosită prima dată de Tsunoda, în 1965 (vezi

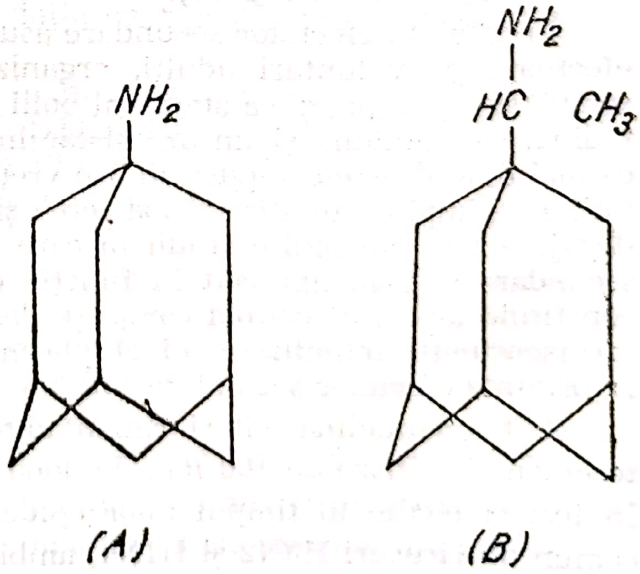


Fig. 13.11 — Formulele amantadinei *(A)* și rimantadinei *(B)*.

fig. 13—11 *B*) — constă în utilizarea lor cu succes, în profilaxia epidemiilor de gripă în S.U.A., U.R.S.S. şi alte ţări europene. Eficienţa amantadinei sau rimantadinei s-a dovedit a fi de acelaşi ordin (aproximativ 70%) cu cea a vaccinului inactivat antigripal, în teste clinice efectuate în cel puţin opt ţări, pe mai mult de 100 000 de voluntari. În unele ţări (de exemplu, U.R.S.S.) se preferă rimantadina, deoarece are anumite avantaje în comparaţie cu amantadina : are o arie mai largă de acţiune, inhibă mai accentuat replicarea virusurilor, este mai puţin toxică, respectiv, poate fi folosită, în doze mai mici. În plus, are un indice terapeutic — 64 — mai ridicat decît al amantadinei — 8 —, putînd fi folosită şi ca agent terapeutic.

S-au efectuat numeroase studii comparative pe animale, privind efectele celor doi compuşi asupra transmisibilităţii virusului gripal, efectelor secundare ş.a. În tabelul 13—IX redăm (după Schulman, 1968) rezultatele unui experiment privind transmisibilitatea virusului gripal la şoareci.

TABELUL 13-IX

Efectele amantadinei şi rimantadinei asupra transmisibilităţii virusului gripal la şoarece*

(după J. Oxford, A Galbraith, în „*Viral Chemotherapy*", 1984)

Compus administrat (20 mg/kg)	Nr. şoareci infectaţi (contact)	
	Nr.	%
Tampon salin	35/60	58,3
Amantadina	28/60	48,3
Rimantadina	5/60	8,3

* Ambii compuşi au fost daţi, pe cale i.p., la 0,5 ore înainte şi la 12, 24 şi 36 de ore postinfecţie cu virus gripal A. Gradul de contaminare s-a evaluat prin izolarea virusului.

În experimente privind pierderea în greutate şi descreşterea consumului de apă, rimantadina s-a arătat mai eficientă în compensarea acestor efecte (Rabinovici, 1972).

În privinţa efectelor secundare asupra sistemului nervos central, teste efectuate pe voluntari adulţi, organizaţi în eşantioane comparabile ca vîrstă, sex, precum şi ca stadiu al bolii şi cărora li s-au administrat amantadină, rimantadină şi un antihistaminic — clorfeniramina —, au arătat că nici unul dintre compuşi nu are vreun efect semnificativ asupra activităţilor ce implică atenţia, cunoaşterea şi memoria. O concluzie importantă, degajată din mai multe studii în care s-au comparat eficienţa şi efectele secundare şi s-au apreciat în funcţie de unele date farmacodinamice, o constituie faptul că cei doi compuşi, deşi sînt diferiţi din punct de vedere farmacocinetic (eliminare, nivel plasmatic, metabolizare ş.a.), nu diferă în privinţa efectelor secundare.

Atît amantadina, cît şi rimantadina şi-au arătat eficienţa ca agenţi terapeutici în doze de 100 mg, de două ori pe zi, timp de 1—3 săptămîni. În testări făcute în timpul unor epidemii cu virus gripal A, cauzate în comun de virusuri H3N2 şi H1N1, ambii compuşi s-au dovedit eficienţi şi ca agenți profilactici, administrați în aceleași doze (100 mg×2/zi, timp de 7 zile). Astfel, la un procent de dezvoltare a bolii de 40,9 la grupa-martor tratată cu placebo, procentele de dezvoltare a bolii în grupele tratate cu amantadină și rimantadină au fost de 8,9 și, respectiv, 14,3. De notat că rimantadina nu a provocat efecte secundare negative nici ca agent profilactic.

Asocierea cu vaccinurile. Avîndu-se în vedere deosebirile fundamentale ale căilor de acțiune dintre chimioterapice și vaccinuri sau situația specială a unor persoane supuse unor riscuri deosebite (diabet, afecțiuni cardiace, indispoziții respiratorii cronice) s-a testat eficiența asocierii acestor agenți antivirali. În cazul unei epidemii sau pandemii cauzate de un virus gripal A, agentul chimioterapic poate fi administrat imediat, în timp ce vaccinul se prepară, se distribuie și procesul de apărare imun este în curs de desfășurare. În tabelul 13-X se dă un exemplu de testare a asocierii vaccinului gripal (H3N2) — administrat două zile înaintea declanșării epidemiei — cu rimantadina (200 mg/zi) în cazul unei epidenii cauzate de un virus gripal A(H1N1) (U.R.S.S., 1981).

TABELUL 13-X

Efectul profilactic al asocierii rimantadinei cu vaccinul antigripal
(J. Oxford, A. Galbraith, în „*Viral Chemotherapy*", 1984)

Grupe	Protecție %	Durata medie (zile)	
		temperatură	boală
V+R	60	2,6	4,8
Pl+R	32,4	3,6	5,8
Pl+V	37	4,2	6,0
Pl	—	4,5	6,2

V = vaccin ; E = rimantadină ; Pl = placebo.

Efectul slab (37%) al vaccinului (necorelat antigenic) se atribuie interferenței virale sau inducției de interferon. Creșterea protecției în grupa în care vaccinul a fost administrat în asociație cu rimantadina este foarte semnificativă.

Asocierea cu interferoni. În teste efectuate pe culturi de celule infectate cu virus gripal A/WSN (H1N1) (10^{-2}PFU/cel.), efectul de reducere a numărului de plaje a fost de 10 ori mai mare cînd celulele au fost tratate cu interferon și amantadină, față de efectele celor doi agenți luați separat.

Asocierea cu compuși de sinteză. Efecte sinergice pozitive au fost obținute, experimental, prin asocierea amantadinei cu 5-fluorouracilul (inhibitor al sintezei acizilor nucleici), cu d,l-etionină (inhibitor al sintezei proteice), precum și cu ribavirina (inhibitor al sintezelor virusurilor gripale, atît de tip A, cît și de tip B).

Inducerea rezistenței față de amantadină. În experimente pe șoareci, în care s-au făcut pasaje ale unui virus gripal A în prezența unor concentrații mari de amantadină, s-au selectat tulpini rezistente, din plămînii animalelor, chiar după un singur pasaj, în condițiile unor concentrații foarte mari de amantadină. Nu s-a reușit izolarea de tulpini virale rezistente de la oameni infectați cu virus gripal și tratați cu amantadină.

Analize ale unor recombinanți virali ce conțineau gene de la tulpini parentale — atît amantadin-rezistente, cît și amantadin-sensibile — par a indica gena 7, ce codifică proteina M, ca fiind responsabilă a rezistenței. Studii ulterioare însă (Scholtissek și Faulkner, 1979) au arătat că rezistența are un determinism poligenic mai complex.

Amantadina nu are acțiune virulicidă. Deși s-a cercetat intens modul ei de acțiune, problema nu a fost încă clarificată. Primele cercetări au dus la concluzia că amantadina acționează la nivelul membranei, împiedicînd pătrunderea virionilor. Ea ar altera unele proprietăți ale membranelor — ca, de exemplu, temperatura tranziției de fază — cu efecte asupra rigidității acestora și, în consecință, a impenetrabilității pentru virionul gripal. Cercetări în care s-au folosit tehnici de imunoelectronomicroscopie au sugerat posibilitatea pătrunderii virionului prin fuziune cu membrana celulară, întrucît s-au observat, la nivelul membranei plasmatice, virioni parțial dezintegrați. În alte experimente nu s-a putut stabili vreun paralelism între cantitatea de amantadină folosită și numărul de virioni intravacuolari.

Experiențe în care s-au folosit tehnici de electronomicroscopie și de marcare în pulsuri, pentru a se urmări primele evenimente ale existenței virionilor pătrunși în celule, au dus la concluzia că amantadina ar acționa după fazele tîrzii ale deproteinizării, dar înainte de inițierea transcrierii ARN viral și sinteza unor produse de transcriere precipitabile cu acid tricloracetic sau detectabile pe alte căi. Problema este complicată mai ales de faptul că această inhibare nu este legată de inhibarea ARNp-ARNd asociată virionului. Deși posibilitatea inhibării enzimei virale *in vitro* a putut fi obținută, nu s-a putut demonstra acest efect *in vivo*.

O altă cale posibilă o constituie cea a interacțiunii timpurii amantadină-proteină M, care ar preveni deproteinizarea tîrzie și transcrierea (deși, cum s-a arătat, rezistența implică mai multe gene virale).

Fiind lizozomotropă (ca și alte amine ca, de exemplu, *acetatul* și *clorura de amoniu*), amantadina tinde să mărească valorile pH-ului intralizozomal. Cum fuziunea și penetrarea în lizozomi este pH-dependentă, iar parcurgerea ciclului de replicare virală depinde de acest eveniment, alcalinizarea pe care o determină amantadina duce la întreruperea procesului infecțios.

Rimantadina. Ca și amantadina, nu are acțiune virulicidă. Ea nu influențează semnificativ verigile metabolismului celular implicate în replicarea virală. Ea nu protejează celula nici dacă este pusă în contact cu aceasta 5 ore înainte de infecția experimentală cu virus gripal; exercită un efect protector dacă este dată celulei la 2—4 ore după infecția experimentală. Totuși, nu se știe încă în ce stadiu al procesului infecțios acționează. S-a stabilit că rimantadina nu afectează semnificativ adsorbția, penetrarea sau transportul genomului. S-a putut însă demonstra efectul său inhibitor asupra transcrierii primare a ARN viral deși, ca și în cazul amantadinei, nu inhibă semnificativ ARNp indus de virus.

Cercetări asupra determinării genetice a sensibilității virusurilor gripale la rimantadină au demonstrat nu numai o implicare a genei 7, ce codifică proteina M — ca și în cazul amantadinei —, ci și a fragmentului ARN 8, responsabil de sinteza proteinei virale non-structurale.

Concluzia ce se degajă din cercetările privind mecanismele de acțiune ale ambilor compuși antivirali este că, deși majoritatea datelor indică un efect asupra procesului de transcriere — mai exact, asupra evenimentelor dintre sfîrșitul deproteinizării și începutul transcrierii ARN viral — totuși, locul (locurile) unde acești compuși acționează este, încă, o problemă care-și așteaptă soluția completă.

Derivați ai amantadinei, cu activitate antivirală. În dorința de a se mări cît mai mult indexul de activitate antivirală, dar și pentru a se lărgi această activitate — în primul rînd prin includerea în raza lor de acțiune a virusurilor gripale de tip B — s-au sintetizat sute de derivați ai amantadinei.

O serie de derivați care includ compuși mai activi decît cel de bază o reprezintă *N-metilenaril-* și *N-benzilderivații.* Printre cei mai activi se pot cita derivatul cu gruparea NO_2 în poziția 2 a benzilului (index = 1 500) și, mai ales, *tioglicolatul* și *mercaptopropionatul* (index = 6 000).

Un alt grup de *derivați ai chinonei adamantanului* cu substituenți la atomul C-punte al nucleului adamantanic, precum și derivați de la adamantan substituiți secundar — în care se includ și *spiro-compușii* — au fost, de asemenea, sintetizați și testați. N-metil derivații sînt de 3 ori mai activi decît amantadina, iar *adamantan-spiro-3'-pirolidinele* cu substituenți alchilici mai mici au activități asemănătoare. Mărirea substituenților la atomul de azot micșorează activitatea *in vivo.*

Derivații ciclohexanici nu au activitate antivirală, iar *diamantan-spiro-3'-pirolidina* și *derivatul său N-metilat* sînt mai slab active decît N-metilul ca atare, *in vivo.*

Nici un spiro-compus nu este activ împotriva virusurilor gripale B.

În seria de *analogi pirolidinici* cu cicluri de 6 și 7 atomi, cei mai mulți sînt citotoxici, cu excepția *derivatului piperidinic,* cu activitate asemănătoare amantadinei.

S-a încercat, de asemenea, creșterea activității antivirale prin copolimerizarea *N-vinilpirolidonei* și *N-alilaminoadamantanului.* Pentru a se obține polimeri aquosolubili s-au sintetizat compuși prin atașarea unei molecule active la un compus nedegradabil *in vivo* și prin condensarea grupării aminice cu un grup al unui polimer care să dea o legătură capabilă a fi hidrolizată în celulă și, astfel, să elibereze amantadina. Cercetările sînt în curs.

13.2.3. PEPTIDE INHIBITOARE ALE REPLICĂRII VIRALE

Succesele tehnice care au făcut posibilă descifrarea secvenței unui mare număr dintre cele mai diverse proteine, cu relativă ușurință și cu un remarcabil randament, au permis conturarea unei strategii cu totul noi și avantajoase : depistarea, identificarea și analizarea structurii centrului (sau centrilor) activ al proteinei funcționale de interes și blocarea acestei activități prin introducerea în mediu a unei secvențe analoage, „înșelătoare", pentru proteina interactivă. În acest subcapitol ne vom referi la posibilitatea de blocare a unor proteine virale, cum sînt : proteina de fuziune (F) a paramyxovirusurilor și hemaglutinina (HA) virusurilor gripale.

Proteina F este una din cele două glicoproteide ce compun proiecțiile *(spikes)* care emerg din membranele paramyxovirusurilor. Este o proteidă plurifuncțională, fiind implicată atît în procesul de pătrundere a virusului în celulă, cît și în procesele de fuziune a membranei virale cu cea celulară (indusă de virus) și de hemoliză. Inactivă în starea inițială (F_0), proteina se activează prin acțiunea proteolitică a unei enzime a celulei atacate, cu formarea a două peptide legate printr-o punte disulfidică — F1 și F2 —, prima fiind cea activă, prin generarea unei noi terminații la capătul $-NH_2$. F1 se caracterizează printr-o secvență hidrofobă și înalt conservativă la diferitele paramyxovirusuri. Hidrofobicitatea — care face posibilă interacțiunea cu membrana bilipidică virală — și constanța structurală au sugerat ideea că această secvență este cea funcțională, fapt verificat ulterior prin studii conformaționale (s-a observat că, în urma hidrolizei, proteina F suferă o modificare conformațională cu expunerea unei regiuni hidrofobe) și prin testarea proprietăților inhibitoare ale unor peptide cu secvență similară cu cea a proteinei F1.

Pornindu-se de la aceste constatări, s-a elaborat o nouă direcție în chimioterapia antivirală, prin testarea puterii inhibitoare a unor peptide artificiale și ai unor derivați ai acestora, a căror structură mimează pe cea a secvenței (lor) ce conferă proprietăți specifice proteinelor funcționale.

Efecte pozitive semnificative s-au obținut cu o serie de oligopeptide cu secvențe asemănătoare polipeptidelor F1 ale diferitelor paramyxovirusuri (tabelul 13-XI).

Din rezultatele expuse în tabelul 13-XI se pot degaja cîteva concluzii : *a)* oligopeptidele care imită perfect secvența N-terminală a proteinei F1 inhibă specific funcția acesteia ; *b)* cu cît oligopeptidul este mai lung, activitatea sa este mai intensă (heptapeptida este de 10 ori mai activă decît tripeptida) ; *c)* blocarea capătului N-terminal cu diverși radicali hidrofili (Z) sau hidrofobi (DNS, tBOC) determină o creștere marcantă a activității ; *d)* blocarea capătului C-terminal determină, dimpotrivă, o scădere a activității ; *e)* configurația sterică influențează semnificativ activitatea (tripeptida Z-dF-lF-G este de 100 de ori mai activă decît omologul său Z-lF-lF-G). În privința rolului posibil jucat de agenții blocanți, este probabil că aceștia influențează configurația sterică a peptidului prin variațiile hidrofobicității și/sau a polarității capetelor N-, respectiv C-terminale. În sprijinul acestei explicații vine și influențarea activității antivirale de către structura d sau l a fenilalaninei. Se poate, de asemenea, ca prezența unui d-aminoacid să joace și un rol de protejare a oligopeptidului împotriva degradării lui de către proteazele celulare. Examinarea acestui tabel permite încă două remarci : *1)* sensibilitatea deosebită a virusului rujeolic ; *2)* sensibilitatea la acțiunea tripeptidei Z-dF-lF-G a unei mutante a virusului rujeolic (R93) rezistent la analogul acesteia : Z-dF-lF-1(NO_2)Arg. Lipsa citotoxicității mărește mult

TABELUL 13-X

Structurile secvențiale ale regiunilor N-terminale ale polipeptidelor F1 din diferite paramyxovirusuri comparativ cu structurile secvențiale ale unor polipeptide active (P. W. Choppin și colab., în „*Problems of Antiviral Therapy*", 1983)

Virus	Secvența F1	Analog	Concentrața 40% eficientă (nM)
S	F–F–G–A–V–I–G–T–I–A–L–G–V–A–T–A–A–G	(R) Z–dF–lF–G–dA–dV–dI–G	0,02
		dF–lF–G–dA–dV–dI–G	130,0
SV5	F–A–G–V–V–I–G–L–A–A–L–G–V–A–T–A–A–G	Z–dF–lF–G	0,20
		Z–lF–lF–G	23,0
NDV	F–I–G–A–I–I–G–G–V–A–L–G–V–A–T–A–A–G	DNS–dF–lF–G	0,34
		tBOC–dF–lF–G	2,0
		Ac–dF–lF–G	20,0
		Et–dF–lF–G	20,0
		Z–G–lF–lF–G	870,0
		Z–dF–lF–G	320,0
(S)		Z–dF–lF–G	320,0
(SV5)		Z–dF–lF–G	20,0
R(R93) G(AWSN)		Z–dF–lF–G	290,0

Z = radical carbobenzoxi; *DNS* = radical dansil; *tBOC* = radical butiloxi (terțiar); *Ac* = radical acetil; *Et* = radical etil; *R* = virus rujeolic; *G*= virus gripal; *S* = virus Sendai; *F* = fenilalanina; *G* = glicocol; *A* = alanina; *V* = valina; *I* = izoleucina; *T* = treonina; *L* = leucina; *l* = levogir; *d* = dextrogir.

șansele promovării acestor oligopeptide în rîndul agenților antivirali folosibili în clinica umană.

În privința locului acțiunii acestor oligopeptide, cercetările au dus la concluzia că ele acționează, nu asupra virusului (respectiv, a proteinei F virale), ci asupra celulei, respectiv asupra receptorului capătului N-terminal al polipeptidului F1, probabil prin competiție cu acesta. Întrucît s-a stabilit experimental că diferite oligopeptide inhibă diferite virusuri în măsură diferită, este posibil să fie vorba, în realitate, de o familie de asemenea receptori.

Proteina HA este una din cele două glicoproteide ale proiecțiilor proteice *(spikes)* ale membranelor myxovirusurilor, care îndeplinește două funcții : receptor și agent de penetrare. Fără a avea efect asupra funcției hemaglutinante, o clivare enzimatică cu formarea a două polipeptide legate printr-o punte disulfidică (ca și în cazul paramyxovirusurilor enzima aparține celulei atacate) este necesară pentru activarea infectivității la nivelul fazei de penetrare a acestuia. Spre deosebire de paramyxovirusuri însă, activarea funcției de fuziune se face la un pH acid, probabil prin fuziunea veziculelor endocitare — care conțin virioni — cu lizozomii. Asemănarea între cele două familii, la acest nivel, se extinde și asupra secvențelor polipeptidelor active — în acest caz HA2 — întrucît, cu excepția prezenței glicocolului la capătul N-terminal, acestea sînt identice (tabelul 13-XII).

TABELUL 13-XII

Inhibarea virusurilor rujeolic și gripal cu diferite oligopeptide
(P. W. Choppin și colab., în „*Problems of Antiviral Therapy*“, 1983)

Oligopreptid	Concentrația 50% eficiență (nM)		
	v. rujeolic	v. gripal	Observații
Z–G–lL–lF–G	1 000	20	tip A
Z–G–lF–lF–G	870	53	tip B
Z–G–dF–lF–G	—	23	tip B
Z–dF–lF–G	0,02	290	F1

Din tabelul 13-XII se constată că oligopeptidele ce mimează secvențele HA2 sînt active împotriva virusurilor gripale, dar nu și împotriva virusului rujeolic iar cel ce mimează secvența F1 este, dimpotrivă, activ doar împotriva virusului rujeolic.

Această cale de atac a activității infectante a paramyxo- și orthomyxovirusurilor, bazată pe cunoașterea structurii secvențiale a proteinelor active în acest proces, s-a arătat foarte promițătoare. Pornită de la considerații logice, ea permite, totodată, folosirea oligopeptidelor analoage, prin precizarea locului activ și a modului în care ele interacționează cu structurile virale. Lipsa de toxicitate a acestor compuși le deschide perspectiva folosirii lor în clinica umană.

Aplicarea acestei strategii și la alte familii de virusuri s-a dovedit fertilă. Astfel, nonapeptidul corespunzător terminației carboxilice a subunității 2 a ribonucleotidreductazei virusului herpetic îl inhibă specific, reversibil și necompetitiv (50% la o doză de 22 μM) (1986). De asemenea, substanța P, un neuropeptid alcătuit din 11 aminoacizi care are în comun secvența F-F-G cu capătul terminal -NH_2 al tachykininei, inhibă reversibil virusul rujeolic în culturi celulare (0,6 μM). O acțiune antirujeolică o au și unele triheptapeptide care au secvențe comune cu unitatea F1 a tachykininei.

13.2.4. POLINUCLEOTIDE MONOCATENARE

Se știe că, în anumite condiții, culturi celulare sau animale pot fi protejate de efectele infecțiilor virale prin tratamente cu polinucleotide, în urma inducerii unor interferoni. Despre agenți de protecție celulari se discută într-un capitol special al acestui tratat. În cele ce urmează vom discuta doar acțiunile polinucleotidelor care nu se bazează pe inducerea de interferoni.

În principiu, polinucleotidele monocatenare — în special ARN monocatenar — pot acționa fie prin inhibarea unor enzime specifice implicate în replicarea virală, fie prin mimarea unor segmente ale genomului viral vizat. În primul caz, testările se bazează pe tehnici de măsurare a activităților enzimatice. În al doilea caz însă este necesară cunoașterea secvenței nucleotidice a segmentului de genom viral considerat și, dacă se poate, a rolului acesteia în replicarea virală.

În legătură cu această din urmă problemă, se definește noțiunea de „secvențe strategice“ (Stebbing, 1984) ca fiind acele secvențe nucleotidice ale genomului viral care sînt direct implicate în interacțiunile esențiale cu factori celulari codificați de genomul celular sau de cel viral. Tratarea celulelor infectate cu analogi ai acestor „secvențe strategice“ poate lega factorii cu care acestea interacționează și, astfel, inhiba replicarea virală. Întrucît „secvențele strategice“ se presupun a fi cele care interacționează nemediat cu factori celulari sau virus-induși, avînd funcții de reglare genomică, se poate presupune, în continuare, că aceste secvențe se găsesc în regiunile netraduse ale genomului. Dar aceste regiuni se caracterizează și printr-un înalt grad de conservatism. De exemplu, înlocuind doar un nucleotid (G→A) din această regiune a genomului fagului Qβ, acesta își pierde infectivitatea, ceea ce nu s-a observat în cazul unor asemenea modificări petrecute în secvențele traduse. Această proprietate este foarte avantajoasă pentru categoria de analogi antivirali prezentată, întrucît variabilitatea marcată a acestor secvențe — în special în cazul myxovirusurilor — nu afectează capacitatea lor ca agenți chimioterapici.

13.2.4.1. *Acțiunea analogilor polinucleotidici asupra enzimelor*

a) **Asupra polimerazelor.** Cercetări asupra inhibiției de către polinucleotide a polimerazelor virale ce mediază replicarea unor virusuri animale își au originea în primele analize ale replicării fagilor, în special al fagului Qβ (Haruna, Spiegelman, 1966). Acești autori au reușit să inhibe, *in vitro*, replicarea ARN-Qβ de către replicaza-Qβ. PoliU și poliA inhibă puternic inițierea, dar nu și elongarea, pe cînd poliC și poliG nu au acest efect. Faptul că efectul este mult redus dacă enzima este amestecată cu polinucleotidul inhibitor înainte de contactul cu ARN-matrice sugerează existența pe această matrice a unui loc de legare specific al replicazei și că efectul inhibitor ar rezulta din ocuparea acestui loc de către moleculele ARN monocatenar. Polimerazele non-virale nu par a avea un asemenea loc specific de legare de matricele polinucleotidice.

Un fapt interesant s-a constatat în cazul unor particule defective interferente care par a produce polinucleotide cu acțiune antivirală pe cale biologică, fiind analogi ai secvențelor strategice din genomurile virale ARN. După Huang și Baltimore, în unele cazuri, particulele DI se pot produce datorită inducției sintezei de interferon, dar în alte cazuri particulele DI apar independent, chiar și *in vivo*. Este o direcție promițătoare, dar care necesită încă multe cercetări.

b) **Asupra reverstranscriptazelor (RT).** Acest grup de enzime este cel mai bine studiat în experimente *in vitro*, în culturi celulare și pe animale.

Unele homopoliribonucleotide, în special poliU, au arătat o acțiune inhibitoare asupra unor RT purificate provenind de la diferite ARN ale unor virusuri tumorale. Acest efect nu este însă specific, deoarece sînt inhibate și unele polimeraze non-virale.

Folosindu-se genomuri și enzime virale obținute prin tratarea virusurilor purificate cu detergent s-a testat acțiunea inhibitoare a unor polinucleotide modificate (DeClerq și colab., 1977). Astfel, poli-2-acid azainozinic și poli-2-acid metiltioinozinic s-au dovedit eficiente. Copolimeri ai acizilor inozinic și 2-metilinozinic au activitate intermediară, care depinde de proporția dintre componente. PoliI este activ numai în prezența unui primer/matrice sintetic, fapt neexplicat încă. Introducerea grupării azo- este importantă, întrucît 2-azoderivații poliC și poliU sînt activi, în timp ce poliC este inactiv.

Introducerea ε-adenozinei în poliA, prin tratare cu cloracetamidă, conferă polinucleotidului modificat proprietatea de a inhiba transcrierea lui poliA în prezența oligo dT ca primer, folosind RT a virusului mieloblastozei aviare (AMV).

PoliU inhibă *in vitro* RT a virusului leucemiei murine (MLV)mai puternic decît poliA, dar poliA este mai eficace în culturile de celule. 2'-O-metilderivatul său, ca și 2'-azoderivații poliU și poliC au o eficiență superioară poliU și poliC, probabil din cauza rezistenței lor crescute față de nucleaze. Unii asemenea compuși — poliA și poli-2'-O-metilA — administrați în concentrații mai mari (100 μg/mL) decît cele necesare inhibării replicării (10 μg/mL) inhibă adsorbția virusurilor tumorale ARN. Cercetări efectuate asupra unor polinucleotide care acționează *in vitro* prin inhibarea RT sugerează același mecanism și *in vivo*, întrucît efectele sînt paralele și comparabile. Scăderea efectului inhibitor asupra sintezei MLV în culturi celulare, în cazul unor polimeri asociați sau derivați ai acestora, se pare că se datorează formării de catene duble și triple, ceea ce vine în contradicție cu datele potrivit cărora RT a MLV este inhibată mai puternic de polinucleotidele ce au tendință de a forma policatene.

Lungimea catenei este, de asemenea, importantă. În cazul RT a virusului variolei aviare, de exemplu, inhibarea sa de către polinucleotide scade semnificativ dacă lungimea moleculei inhibitorului scade sub 200 de monomeri și încetează cînd molecula numără mai puțin de 20 de monomeri.

Este de menționat acțiunea inhibitoare a unor heteropolinucleotide naturale — ARNt — asupra RT, dar cercetările în acest sens sînt abia în faza inițială.

Oligonucleotide complementare ale ARN al virusului limfotropic uman tip III al celulelor T sau complementare ADN proviral (20 μM) inhibă RT și expresia genică (proteinele p15 și p24) cu 95%, în mod specific (Zamecnik și colab., 1986).

Cercetări asupra modului de acțiune al polinucleotidelor inhibitoare au arătat că, în general, ele acționează conform unei cinetici competitive reversibile și nu ca matrice pentru enzimă. Afinitatea RT pentru diferiți ARN este mare, atît pentru polinucleotidele inhibitoare de sinteză, cît și pentru cele naturale. Acțiunea lor inhibitoare pare a se exercita mai curînd la nivelul fazei de inițiere decît al celei de elongare.

Pînă în prezent, puține dintre polinucleotidele care inhibă RT *in vitro* și în culturi celulare au fost testate la animale infectate cu virusuri tumorale ARN, iar rezultatele sînt dificil de interpretat.

Efecte pozitive s-au obținut cu poliI — 100—400 μg/șoarece/săptămînă — în privința creșterii duratei medii de supraviețuire (DMS). Efectul este amplificat dacă poliI se asociază cu poliC, dată în aceleași doze, la 4 ore, după poliI (Stebbing, 1977). Rezultate pozitive s-au mai obținut cu derivatul 2-O-metilat al poliA (10 μg) la șoareci nou-născuți infectați cu virusul leucemic (Moloney). Mai eficient încă este derivatul 2′-O-etilic al poliA care inhibă manifestarea infecției cu 94%.

Se pare că aceste efecte pozitive se datorează stimulării răspunsului imun față de virus, întrucît nivelul anticorpilor precipitanți este crescut. Totuși, acest efect imunomodulator apare și la șoarecii tratați și neinfectați. O dificultate în plus în acceptarea acestei explicații o constituie acțiunea poli-9-viniladeninei și a poli-1-viniluracilului — inhibarea RT a MLV, precum și a replicării acestuia în culturi celulare și la șoarece — în care nu sînt implicate nici răspunsul imun, nici producerea de interferon.

13.2.4.2. *Acțiunea polinucleotidelor ARN monocatenare asupra virusurilor litice*

Homopolinucleotidele. PoliC și poliI administrate împreună sau secvențial (la 4 ore interval) protejează șoarecii de efectul letal al infecției cu virusul encefalomiocarditic (EMCV). Este un efect direct al naturii catenei, căci el depinde de natura nucleotidelor și de numărul lor și nu de inducerea de interferon circulant sau de stimularea răspunsului imun (protecția apare și la animalele imunosupresate).

Cele mai eficiente polinucleotide împotriva virusului gripal (VG), *in vitro,* s-au dovedit a fi poliA, poliI și poliU și, în special, derivatul tiolat al poliU (poli-acid 4-tiouridilic), precum și un copolimer al citidinei și 4-tiouridinei — poliC, S^4, U_{10}. Toți aceștia inhibă transcriptaza virală. Pentru aceasta însă este necesară prezența scheletului glucidofosfatic, căci analogii vinilici ai poliU și poliA nu sînt activi. Este de remarcat că aceste polinucleotide inhibă, pe lîngă o serie largă de tulpini gripale A, și o tulpină de tip B, la o concentrație foarte scăzută, de ordinul 10^{-8}M.

ARNt. Unii ARNt, atît din procariote, cît și din eucariote conferă un grad semnificativ de protecție la șoarecii infectați cu unele picornavirusuri, ca și cu virusul Semliki Forest. Această protecție nu se bazează pe inducție de interferon și nu se datorează unui mecanism strict local (locul introducerii materialului testat), întrucît căile de tratament și infecție sînt diferite. Deși, în discuțiile asupra mecanismelor de acțiune, au fost eliminate o serie de posibile căi de acțiune, mecanismele care asigură, *in vivo,* efectul antiviral este încă neprecizat.

Ca și calea folosirii oligopeptidelor, cea a folosirii polipeptidelor și a derivaților lor constituie o strategie care poate aduce marcante beneficii.

13.2.5. EFECTUL FOTODINAMIC INACTIVANT

Primele semnalări asupra fotosensibilității virusurilor datează din 1930, cînd Schultz și Krueger fotoinactivează bacteriofagul unei tulpini de stafilococ cu ajutorul albastrului de metilen. Primul procedeu de fotoinactivare a virusului herpetic *in vivo,* cu aplicare în clinica umană, a fost elaborat în 1973 (Felber și colab.) și a cunoscut o rapidă dezvoltare, dar a fost și obiectul multor critici.

Inactivarea fotodinamică este o reacție în care molecula fotosensibilă excitată oxidează un substrat în prezența oxigenului molecular. Fotosensibilizatorul este, de obicei, un compus heterociclic triciclic. Substratul poate fi o moleculă organică simplă, dar și o moleculă izolată sau inclusă într-un sistem viu. Fenomenul depinde de următorii parametri : intensitatea și lungimea de undă a luminii, concentrațiile sensibilizatorului și substratului, concentrația de O_2, pH, precum și accesibilitatea grupărilor fotooxidante și gradul de legare a fotosensibilizatorului de substrat.

Inactivarea fotodinamică poate fi aplicată suspensiilor virale, dar și celulelor infectate cu virusuri, deși celula protejează virusul de acest efect. Eficiența efectului terapeutic al acestuia depinde de permeabilitatea capsidei virale, ca și a membranelor virale și celulare pentru fotosensibilizator (de cele mai multe ori, un colorant).

În elaborarea metodelor terapeutice antivirale de acest tip este foarte importantă ajustarea parametrilor și combinarea lor în funcție de particularitățile modului de acțiune și a proprietăților fiecărui cuplu virus-celulă în parte. De exemplu, condițiile optime în cazul infecției herpetice sînt : pH = 9, t° = 37°C, concentrația colorantului este de 10^{-5}M *(albastru de toluidină* sau *roșu neutru)*. Sensibilizarea maximă a HSV se obține prin cultivarea virusului în celule ce cuprind colorantul. În asemenea condiții fotosensibilizarea este ireversibilă. În privința mecanismului exact al acestui efect predomină două ipoteze : *1)* celulele tratate în aceste condiții pierd parțial capacitatea de a asigura multiplicarea virală și *2)* colorantul se intercalează printre bazele de ADN viral și, în urma reacției de oxidare ce are loc la iluminare, se produc alterări locale ale structurii ADN în urma cărora ciclul replicativ este întrerupt.

Inactivarea fotodinamică este pozitivă în cazul următoarelor virusuri : vaccinal, herpetic, al variolei aviare, rabic, polio, pox, adeno, myxo, Papova, arbo, entero, al encefalitei letargice, Borna și leucemic murin. Dintre afecțiunile cauzate de aceste virusuri, doar față de cele herpetice s-a elaborat o metodologie de tratament. După o perioadă de rapidă și largă răspîndire a acestor metode terapeutice, a urmat însă o perioadă de reținere în urma unor critici ivite privitoare, mai ales, la posibilele efecte secundare tîrzii.

În favoarea aplicării acestei metode în terapia herpetică pot fi aduse următoarele argumente (L.E. Bockstahler, 1984) : *1)* coloranții heterotriciclici au fost folosiți, înaintea antibioticelor, în tratarea rănilor și arsurilor, fără a produce efecte secundare negative ; *2)* tratarea intensivă cu acești fotosensibilizatori ai animalelor sensibile la agenții carcinogeni nu a dus la îmbolnăvirea lor ; *3)* deși HSV fotoinactivat poate induce transformarea celulelor de hamster în cultură, nu există dovezi asupra apariției aceluiași efect la om ; *4)* întrucît HSV este potențial oncogen, este importantă îndepărtarea acestui pericol prin vindecarea cît mai rapidă și eficientă a afecțiunii ce o provoacă.

Criticile aduse acestei metode sînt următoarele : *1)* terapia fotodinamică este oncogenă la șoareci și deci periculoasă pentru om, în ipoteza existenței unui asemenea efect la un interval mai lung de timp. Aceasta s-ar produce prin : activarea potențialului oncogen al HSV, inducerea unor virusuri latente oncogene în celulele tratate, efecte mutagene sau de altă natură cu rezolvare oncogenă indusă în celulele vecine cu leziunea herpetică. *2)* Nu are perspectivă tratarea extremităților nervoase la nivelul pielii, cînd virusul există în stare latentă în ganglioni și pe traiecte nervoase. *3)* Nu există, încă, suficiente date privitoare la efectele tîrzii ale terapiei fotodinamice la om. Trebuie lărgite cercetările pe animale înainte de a se trece la om. *4)* Există studii medicale care pun la îndoială eficiența acestei metode.

13.2.5.1. *Compuși fotodinamici cu activitate antivirală*

Cercetările privind efectul fotoinactivant, *in vitro*, au stabilit că *proflavinsulfatul* (fig. 13-12 *A*) este printre cei mai activi compuși fotodinamici, probabil datorită capacității de penetrare a membranei nucleare a celulei infectate. Este și mai activ asupra suspensiei virale.

Pe scara efectului descrescînd urmează *albastru de metilen* (fig. 13-12 *B*), *eozina Y, albastru de toluidină și rosul neutru* (fig. 13-12 *C*). *Riboflavina* este slab activă iar *fluoresceina sodică* este inactivă.

HSV, atît liber cît și în celulă, mai este inactivat prin tratare cu *8-metoxipsoralen* și *iradiere cu UV*. Derivații de psoralen pătrund cu ușurință prin membranele plasmatică, nucleară și virală, precum și prin capsida virală. Aflați în vecinătatea ADN viral, iradierea cu UV provoacă inactivarea virusului fără pierderea antigenicității. În plus, acest tratament inhibă capacitatea celulei de a produce HSV. HSV expus la lumină în prezența *hematoporfirinei* își pierde atît capacitatea inducerii efectelor patologice celulare, cît și antigenicitatea. *Angelicina* produce un efect similar.

Este de remarcat faptul că HSV-1 și HSV-2 în prezența albastrului de metilen (10^{-3}M) sînt inactivate în proporție de 99,99% dacă sînt supuse simultan luminii și electricității timp de 1 min. În aceleași condiții, hematoporfirina inactivează virusul 100% (Schnipper și colab., 1978). Un efect anti-HSV-1 (tulpinile VR3 și Rapp) s-a obținut prin interacțiunea dintre

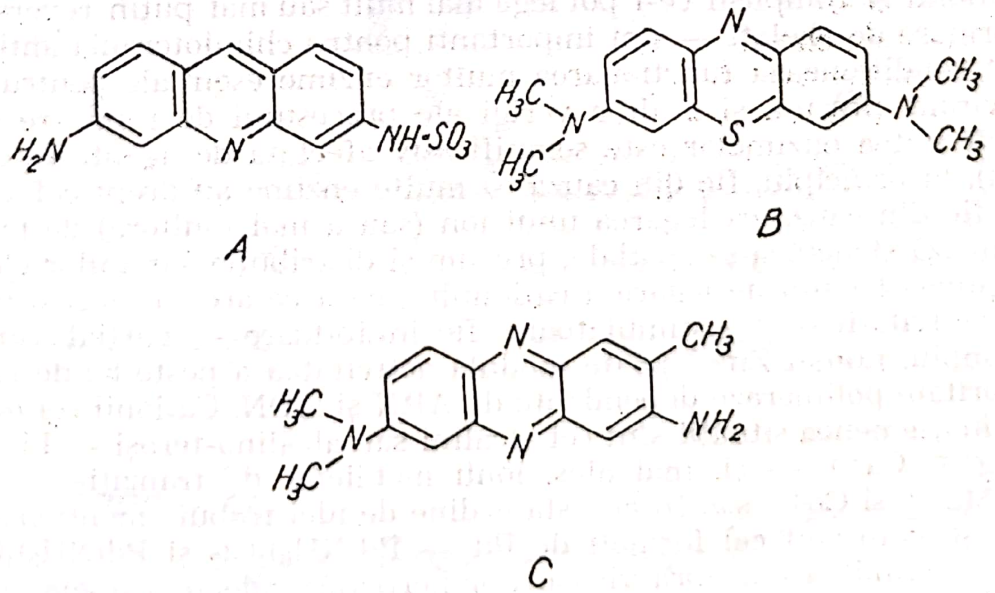


Fig. 13-12 — Formula proflavinsulfatului *(A)*, a albastrului de metilen *(B)* și a roșului neutru *(C)*.

violamicina BI și *ADN-HSV-1*. Inhibarea produsă într-o fază timpurie a replicării virale se datorează atît acțiunii directe a colorantului asupra HSV, cît și acțiunii asupra ADN al celulei infectate (Iliescu și colab., 1981).

În clinică, primele testări s-au făcut în 1963 (Felber și colab.) pentru vindecarea leziunilor provocate de virusul vaccinal în corneea de iepure și pentru tratarea keratitei herpetice la iepuri (Moore și colab., 1972). Felber și colab. (1973) au inițiat acest tip de tratament la om obținînd rezolvarea infecțiilor cu HSV-1 și HSV-2 și rărirea reinfecțiilor. Procedeul propus este următorul : se rupe vezicula cu un ac steril, se aplică o soluție de roșu neutru 0,1% (proflavinsulfatul s-a dovedit, ulterior, mai eficient) și se iradiază cu lumină fluorescentă (15 W) sau de incandescență (100 W) 15 min la o distanță de 15 cm, cu reexpunere la lumină după 1—6 ore și, eventual, repetare. În testări dublu orb, cu loturi-martor sănătoși cărora li s-a administrat colorant-placebo și lumină, s-a obținut o încetare a durerilor și o diminuare a simptomelor, inclusiv o scurtare a timpului de vindecare a leziunilor. În diverse variante, tratamentul a fost aplicat cu succes în cazuri de herpes genital, cu efecte pozitive similare.

Există însă un număr important de lucrări care infirmă eficacitatea acestui tip de tratament. În unele lucrări se propune iradierea cu o sursă laser, în roșu și infraroșu.

În concluzie, avînd în vedere factorii de risc pe termen lung pe care-i implică această metodă, sînt necesare încă serioase cercetări virusologice, precum și cercetări de fotobiologie și fotochimie privind acțiunea și dozarea efectului fotodinamic, în special în cazul pielii, aspecte legate de agentul fotodinamic — structuri, penetrare a membranelor, a pielii, concentrații, pH, temperaturi, intensitate, tip și timp de iradiere, remanență ș.a. — dublate de testări corespunzătoare ale efectelor secundare negative, în special cel oncogen.

13.2.6. CATIONI ȘI AGENȚI DE CHELARE AI CATIONILOR

Cationii și compușii ce-i pot lega mai mult sau mai puțin reversibil — prin formare de chelați — sînt importanți pentru chimioterapia antivirală, întrucît condiționează funcționarea multor enzime esențiale pentru replicarea virală, precum și a altor verigi ale procesului de replicare virală.

Activitatea enzimelor este semnificativ afectată de agenți de chelare (liganzi), în principiu, fie din cauză că multe enzime au drept cofactor un cation, fie din cauză că legarea unui ion (sau a mai multora) de proteină influențează structura sa spațială, precum și distribuția sarcinilor electrice din regiunea locului de legare a cationului, ceea ce are ca efect o modificare a activității — fie stimulatoare, fie inhibitoare — parțial sau total. De exemplu, numai Zn^{++} poate modula activitatea a peste 80 de enzime, în majoritate polimeraze dependente de ARN și ADN. Cationii cei mai implicați în asemenea situații sînt cei alcalini sau alcalino-teroși — Li^{+}, Na^{+}, K^{+}, Mg^{++}, Ca^{++} — și, mai ales, ionii metalelor de tranziție — Cu^{++}, Zn^{++}, Mn^{++} și Co^{++} ș.a. În această ordine de idei trebuie menționați unii complecși, cum sînt cei formați de Pd — $Pd(NH_3)_4Cl_2$ și $Pd(NH_3)_4Cl_2$ — cu efecte inhibitoare asupra virusurilor herpetice, adeno și unele virusuri ARN, sau de Pt — cis-$[Pt(NH_3)_2Cl_2]$ —, cu anumite activități antigripale și antipolio.

Acești cationi joacă un rol în replicarea virusurilor infectante atît prin acțiune directă — de exemplu, asupra enzimelor replicative —, cît și indirectă, prin metabolismul celular. Astfel liganzii — fiind capabili să influențeze concentrația, distribuția și interacțiunile dintre cationi și factorii celulari și virali ce asigură declanșarea și desfășurarea procesului infecțios — pot fi folosiți ca agenți antivirali. Faptul că, de cele mai multe ori, la concentrațiile la care sînt activi ca agenți antivirali sînt și toxici pentru celulele-gazdă limitează drastic numărul compușilor ce pot fi folosiți *in vivo* în combaterea sau prevenirea bolilor virale.

În cele ce urmează vom descrie doar principalii compuși care au dovedit că au o anumită capacitate de inhibare a procesului infecțios, la o anumită etapă a acestuia și cu o suficientă specificitate, în sensul interferării cu anumiți factori metabolici ai procesului infecțios, dar nu și ai celulei-gazdă.

Inhibitori ai enzimelor virale. Inhibarea enzimelor virale este una din căile principale de acțiune chimioterapică, întrucît ciclul viral conține cîteva asemenea ținte. Dintre acestea se detașează polimerazele ADN și ARN (ADNp, ARNp)-dependente de ARN (ARNd) — cum este reverstranscriptaza (RT) — care sînt specific virale și nefolosite de celula-gazdă, ceea ce dă posibilitatea găsirii unui agent inhibitor selectiv al enzimelor virale. Cele mai multe polimeraze, dacă nu toate, sînt zinc-enzime a căror activitate mai cere și prezența Mg^{++} și/sau Mn^{++}. *8-oxihidrochinolina* inhibă RT a virusului sarcomului Rous, iar *8-hidroxichinolina* (fig. 13-13 *A* și *B*), *1, 10-fenantrolina* (fig. 13-13 *C*), *acidul etilendiaminotetraacetic (EDTA)* (fig. 13-14 *A*) și *acidul etilenglicol-bis-(β-aminoeter)-N,N,N′,N′-tetracetic (EGTA)* (fig. 13-14 *B*) inhibă RT a AMV. $EDTANa_2$

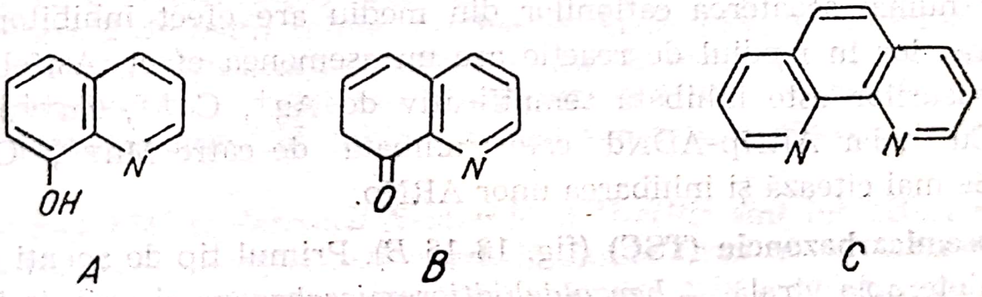
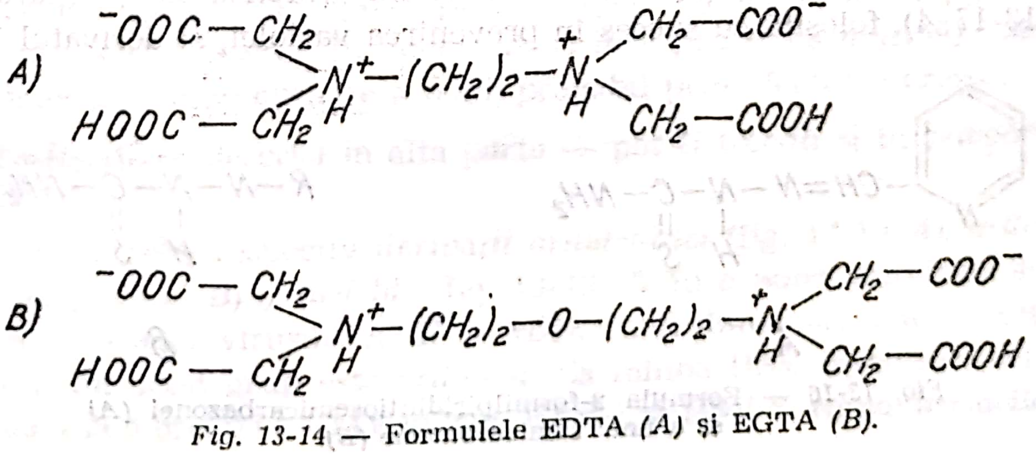


Fig. 13-13 — Formulele 8-hidroxichinolinei (*A* — forma hidroxilică, *B* — forma chinonică) și a 1,10-fenantrolinei (*C*).



$$(^{-}OOC-CH_2)(HOOC-CH_2)\overset{+}{N}H-(CH_2)_2-\overset{+}{N}H(CH_2-COO^{-})(CH_2-COOH)$$

$$(^{-}OOC-CH_2)(HOOC-CH_2)\overset{+}{N}H-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-\overset{+}{N}H(CH_2-COO^{-})(CH_2-COOH)$$

Fig. 13-14 — Formulele EDTA (*A*) și EGTA (*B*).

în asociație cu cisteina și gluconatul de calciu (Rodilemid) (R. Dinu și I. Dinu, 1982) dă bune rezultate, în clinica umană, ca antiherpetic, antiinflamator și imunomodulator.

Cistamina, penicilamina și *selenocistamina* (fig. 13-15) inhibă ARNp-ARNd — o Zn^{++}-enzimă — a virusului gripal ca și alți liganzi, cum sînt : *selenocistina, tiosemicarbazonele heterociclice, poliaminele alifatice, batofenantrolina* și *acizii batocuproinsulfonici, di-* și *trietilentetramina, 2,2′-bipiridin, ditizona* și unii coloranți *(negru solocrom, albastru eriocrom* ș.a.).

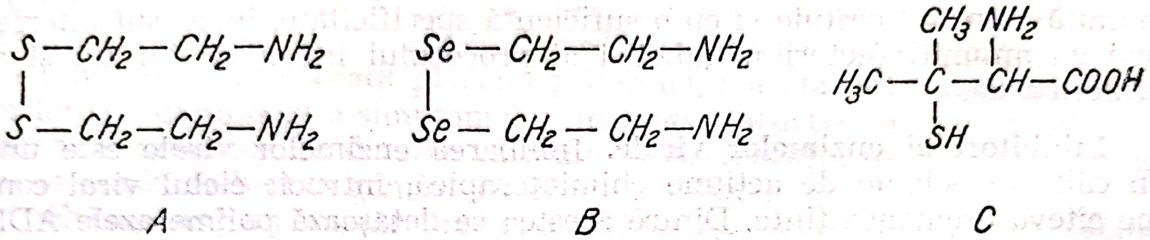


Fig. 13-15 — Formulele cistaminei *(A)*, selenocistaminei *(B)* și penicilaminei *(C)*.

Ribonucleoziddifosfatreductaza — o Fe^{++}-enzimă indusă de HSV — este specific inhibată de derivați heterociclici ai carboxialdehidtiosemicarbazonei ca, de exemplu, *2-formilpiridintiosemicarbazona* (fig. 13-16 *A*).

Neuraminidaza VG are drept cofactor Ca^{++}. În consecință, activitatea ei — importantă pentru faza de penetrare — este inhibată reversibil de către EDTA.

Nu numai scoaterea cationilor din mediu are efect inhibitor, ci și adăugarea lor în mediul de reacție are un asemenea efect. Astfel, RT a retrovirusurilor este inhibată semnificativ de Ag^{+}, Co^{++}, Zn^{++}, Cd^{++}, Ni^{++}, Cu^{++}, iar ARNp-ADNd este inhibată de către Mn^{++}, Co^{++} și Cd^{++}. Se mai citează și inhibarea unor ARNp.

Tiosemicarbazonele (TSC) (fig. 13-16 *B*). Primul tip de agenți folosiți în chimioterapia virală — *benzaldehidtiosemicarbazona* și unii derivați ai săi — aparțin acestui grup. Cei mai importanți reprezentanți ai săi sînt derivatul metilic *isatin-β-tiosemicarbazona (Metisazona ; Marboran)* (fig. 13-17 *A*), folosită cu succes în prevenirea variolei, și derivatul *3-me-*

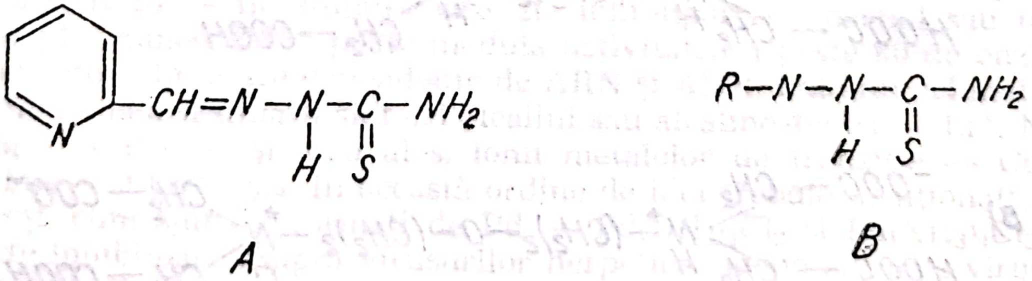


Fig. 13-16 — Formula 2-formilpiridintiosemicarbazonei *(A)* și a unei semicarbazone *(B)*.

til-4-Br-5-formilizotiazolic (fig. 13-17 *B*), agent eficient în combaterea neurovaccinei și variolei iepurilor. VSV, rezistent la acești compuși, s-a dovedit sensibil la unii derivați ai bis-tiosemicarbazonei, așa ca *3-etoxi-2-oxobutiraldehida hidroclorică, ketoxal-bis-tiosemicarbazona* (fig. 13-18) care inhibă ARNm și sinteza proteică virală, dar și cea celulară.

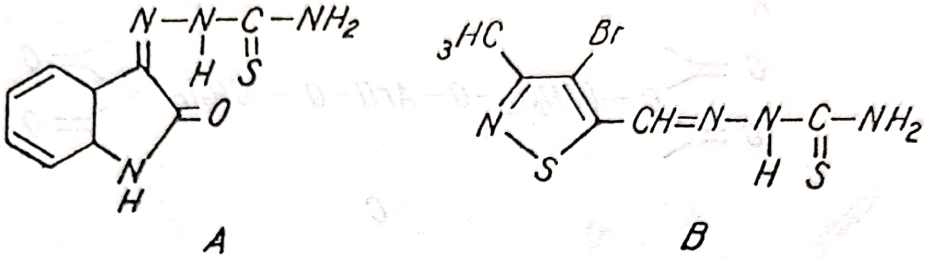


Fig. 13-17 — Formula isatin-β-tiosemicarbazonei *(A)* și a 3-metil-4-Br-5-formilizotiazoltiosemicarbazonei *(B)*.

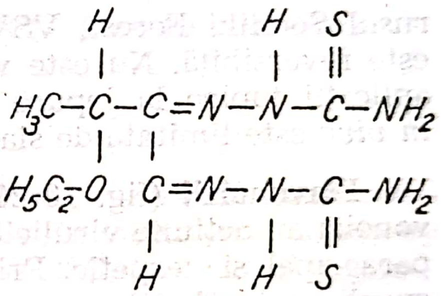


Fig. 13-18 — Formula ketoxal-bis-tiosemicarbazonei.

Dintre derivații α-(N)-heterociclici ai TSC, *1-formilizochinolina* și *2-formilpiridil-derivații* inhibă replicarea ADN-HSV, al limfomei canine și vaccinei. *Derivații acetil-piridinici* — ca, de exemplu, *azacicloheptanil-2-acetilpiridin-TSC* — sînt buni inhibitori ai HSV-1 și HSV-2, *in vitro*. *1-* și *2-formilpiridin-TSC* inhibă virusul sarcomului Rous în culturi celulare.

Isatin-β-TSC și *derivații N-metilic* și *N-etilic* sînt inhibitori eficienți ai poxvirusurilor. Aceștia acționează în fazele tîrzii ale ciclului viral, se pare, în cele de asamblare și maturare, mai ales prin instabilizarea ARNm. Acești compuși inhibă și un număr de virusuri vaccinale *(4′,4′-dimetilisatin-TSC)*, polio [*isatin-3-(4′,4′-dibutil)-TSC*], leucemice (Moloney) *(1-metilisatin-β-4′,4′-dietil-TSC)*. Metisazona inhibă activitatea RT a unor virusuri lente (Visna/Maedi). În unele cazuri însă (leucemia murină) ; Metisazona determină o accentuare a bolii, probabil prin efectul supresor.

Fosfonații — descriși în altă parte — pot fi trecuți și în categoria liganzilor.

β-Dicetonele, respectiv *derivații arilalchilici* (fig. 13-19 *A*), *ariloxialchilici* (fig. 13-19 *B*) și *aril-bis* (fig. 13-19 *C*) au o bună activitate inhibitoare asupra unor virusuri ARN și ADN. Unul dintre cei mai promițători compuși din acest grup este *arildona*. Ea inhibă HSV în culturi celulare (adăugată la 6 ore, p.i.), CMV murin, HSV-1 și HSV-2, rhinovirusurile, vi-

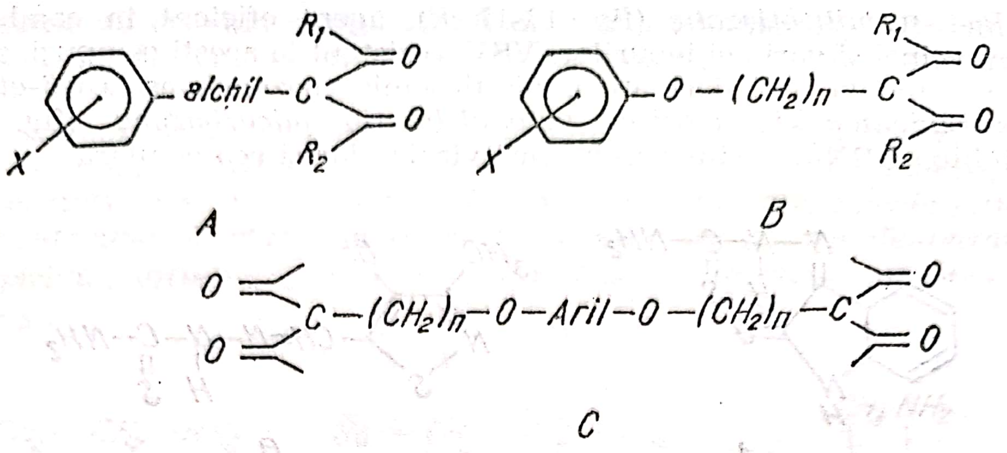


Fig. 13-19 — Formulele derivaţilor β-dicetonici arilalchilici *(A)* ariloxialchilici *(B)* şi aril-bis *(C)*.
$X=2\text{-Cl}, 4\text{-OCH}_3$; $n=6$; $R_1=R_2=CH_3$.

rusul Semliki Forest, VSV şi virusul Coxsackie 9, *in vitro*. Acţiunea sa este reversibilă. Nu este virulicid. Este eficient în infecţiile herpetice, în aplicaţii topice la iepure (ochi), cobai (piele), şoarece (vagin). Acţiunea *in vivo* este limitată de slaba penetrabilitate.

Flavonoizii (fig. 13-20). *Quercetina, morina, rutina* şi alţi cîţiva flavonoizi au acţiune virulicidă asupra virusurilor cu anvelopă : pseudorabic, paragripal şi herpetic. Primele două sînt active profilactic împotriva virusului rabic la şoarece, a encefalitei induse de virusul Mengo — la şoarece prin administrare orală — şi împotriva VSV — în culturi celulare (inhibiţie maximă cu doze de 200 μg/mL, date 6—8 ore a.i.).

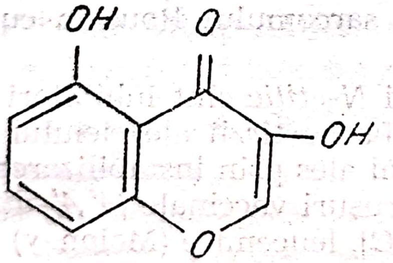


Fig. 13-20 — Structura de bază a flavonoizilor.

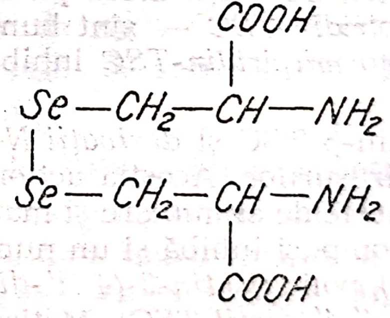


Fig. 13.21 — Formula selenocistinei.

Selenocistina (fig. 13-21) este activă împotriva virusului gripal PR/8 şi al sarcomului Rous la găini, prin inhibare selectivă a ARNp, dar nu şi a ARNp-ADNd.

Derivaţi ai 8-hidroxichinolinei (vezi fig. 13-13 *A*). Pe lîngă acţiunea 8-hidroxichinolinei, de inhibare a RT a AMV şi a virusului sarcomului Rous, acţiuni similare le au şi *8-mercapto-*, *8-aminochinolina* şi *8-hidroxichinolin-5-sulfonatul*. Acţiunea *in vivo* este slabă.

2-mercapto-1-(β-4-piridetil)-benzimidazolul (fig. 13-22) inhibă sinteza unei ARNp tîrzii a virusului vaccinal, precum și inducerea ADNp a HSV în celule HeLa. Efectul se datorează dezorganizării structurii nucleolare.

Izoniazida (fig. 13—23) hidrazida acidului piridin-4-carboxilic), în prezența Cu^{++}, inhibă ADNp și activitatea transformantă a virusului sarcomului Rous.

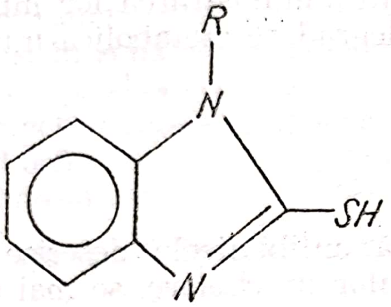


Fig. 13-22 — Formula 2-mercapto-1-(β-4-piridetil) benzimidazolului. R — piridetil.

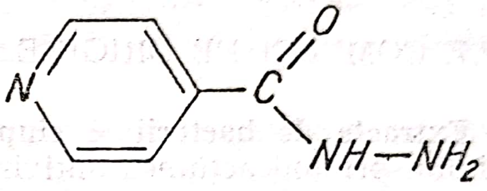


Fig. 13-23 — Formula izoniazidei.

Antibiotice. Unele antibiotice au structuri ce le conferă proprietăți chelatoare de tip flavonoidic. Așa sînt *daunomicina* și *adriamicina* (derivați glicozidici ai antraciclinei), care inhibă, *in vitro,* ADNp al virusului sarcomului Rous, al virusului leucemic (Rauscher) și al AMV. Ele produc la găini o scădere a numărului de sarcoame induse de virusul sarcomului Rous. *Bleomicinele,* o familie de antibiotice glicopeptidice, inhibă replicarea virusului vaccinal în celule HeLa și protejează șoarecii de infecția cu acest virus. *Rifamicine* modificate — agenți chelatori potențiali — inhibă RT a oncornavirusurilor precum și activitatea transformantă a celulelor în cultură, infectate cu aceste virusuri. Inhibiții puternice s-au obținut cu *sucomicina, A-155* și *A-144,* antibiotice extrase din actinomicete, atît *in vitro* — în special asupra HSV — cît și *in vivo,* la animale și om, tot în afecțiuni herpetice (Dundarov și colab., 1979). *Actinomicina D* previne infecția cu CMV, *in vitro,* deși are un anumit efect toxic. Deși nu intră în competiție pentru a deveni agenți profilactici antigripali, *α-amanitina* — extrasă dintr-o ciupercă toxică *Amanites phalloides* — și *camptotecina* constituie agenți utili pentru cercetări privind replicarea myxovirusurilor, furnizînd date interesante asupra dependenței acestui proces de activitatea nucleară a celulei-gazdă, pînă la detalii de ordin submolecular. Un clar efect anti-HSV se obține, *in vitro,* cu alcaloizii unor ciuperci care stau la baza unor preparate ca *Hydergin, Dihydergot,* utile în folosire locală. Alți produși anti-HSV sînt cei obținuți din *filtrate de culturi bacteriene* — *S. faecalis, L. acidophilus, Bifidobacterium lipidium* —, *acidul micofenolic,* izolat din *Penicillium* sp., *ketoxalul,* eficient în leziuni herpetice cutanate, *oxolina,* eficientă în keratite herpetice. Unele efecte secundare limitează folosirea lor în clinica umană.

Derivați glioxalici, 6-Br-naftochinona, tetrazina precum și **acizii humici** și unii **polifenoli** au acțiune anti-HSV, tot datorită proprietăților lor chelatoare.

Această clasă de compuși — agenții chelatori — deși arată în multe cazuri eficiență *in vitro* sînt slab activi sau inactivi *in vivo*. Aceasta se datorează fie rapidei metabolizări, fie imposibilității de a ajunge la țintă în concentrația necesară, fie slabei lor solubilități în apă (de exemplu, TSC — carboxaldehidice heterociclice), ceea ce limitează mult valoarea lor clinică. Se speră ca aceste neajunsuri să fie înlăturate, fie prin introducerea de grupări care să inducă aquosolubilitate crescută, fie prin vehicularea lor protejată și, eventual, țintită (lipozomi), fie prin administrarea lor într-o formă care să genereze structura activă prin degradare metabolică intracelulară.

13.2.7. COMPUȘI DE ORIGINE NATURALĂ

Extracte de bacterii și ciuperci. Pe lîngă antibioticele descrise la capitolul privind acțiunea antivirală a compușilor de chelare, se mai pot cita date privind acțiunea antivirală a altor preparate de origine bacteriană și fungică. *Streptotricinele A, B, C, D și F* inhibă sinteza HA a VG în culturi celulare și la șoareci. *Boromicina* și *carminomicina*, deși toxice pentru fibroblastele de pui, inhibă replicarea VG în embrioni de pui (tulpina A/WSN). *Formicinele A și B* au activitate anti-VG în culturi de celule HeLa și ouă embrionate. *Tunicamicina* inhibă replicarea VG și, în special, glicozilarea glicoproteinelor virale, doar în asociere cu *2-dezoxi-D-glucoza, 2-dezoxi-2-F-D-glucoza, 2-dezoxi-2-F-D-manoza* și, mai ales, *d-glucozamina*. *Anguidina*, izolată din ciuperca *Fusarium sp.* este, de asemenea, un inhibitor al VG *in vitro*. *Edeina* și *higromicina B* inhibă semnificativ sinteza unor proteine virale și a virionilor infectanți, *in vitro*. O eficiență anti-VG moderată, *in vitro*, o au *gossipolul* — un polifenol extras din *Gossipium hirsutum* — și *neuraminina*, extrasă din *Streptomyces sp.*, un inhibitor specific al neuraminidazei VG. O activitate anti-VG, *in vitro*, au arătat-o și trei compuși izolați din diferitele specii de stea de mare.

Alcaloizi. Activități anti-VG, *in vitro, in ovo* și/sau *in vivo*, le-au arătat unele extracte de *Chelidonium majus, Rh. aureum, Herniaria glabra* ș.a., patru *acizi gimnenici* (A, B, C, D) extrași din *G. sylvestris, diuretina, imanina* precum și *teofilina*. Cafeina, singură sau asociată cu NaF, a arătat o bună activitate anti-VG la șoareci (Prahoveanu și colab., 1985).

Extracte vegetale. Unele extracte de *ierburi medicinale* — dintr-un screening larg — au arătat o remarcabilă activitate anti-VG (reducerea titrului HA cu 97—99% și a titrului infectant cu 2,8—4 log). Mai moderată s-a arătat această activitate în cazul unor extracte de *uleiuri esențiale* din diferite specii de Eucalipt. Aceeași situație s-a înregistrat și în cazul unor *extracte apoase și alcoolice de Allium* și *Calvatia*. O marcantă activitate anti-VG, *in vitro* și la șoareci, au arătat-o extractele apoase de *Allium allium sp., Armoracia officinalis, Beta vulgaris* și *Raphanus sp.* Activitatea a fost potențată de asocierea cu *NaF (Allium)* și cu cafeină *(Armoracia)* (Eșanu și colab., 1985 ; Prahoveanu și colab., 1986). Extractul de *Allium* este activ și anti-HSV în culturi celulare. Unele extracte de *alge marine* și de fructe de *Sorbus domestica* sînt active anti-VG, în culturi celulare și la șoareci.

Produse apicole. Extractul apos de *lăptișor de matcă,* netoxic pentru embrionul de pui, este virulicid în prezența suspensiei de VG (A. Derevici, A. Petrescu, 1964). *Extractul apos de propolis* reduce titrul HA din omogenatul de plămîn al șoarecilor infectați cu VG A/PR/8, dar nu reduce mortalitatea și nu mărește DMS (Eșanu și colab., 1981). În cazul infecțiilor herpetice, extractul de propolis este foarte activ *in vitro,* în culturi celulare și la iepuri. Dă bune rezultate și în clinica umană unde este folosit sub două forme ; *NIVCRISOL-D* — pentru infecțiile cutanate și ale mucoaselor — și *NIVCRISOL-O* — pentru infecțiile oculare. Este foarte util și în zona zoster (Crișan și colab., 1976 ; Giurcăneanu și colab., 1983). Un alt produs derivat din propolis — *Candiflor antiviral* — aplicat local, în afecțiuni herpetice periorale și genitale, a dat bune rezultate, mai ales cînd a fost asociat cu *Ig specifică antiherpetică* (i.m.) și *Flumidin* (tablete) (Athanasiu și colab., 1984).

Hormoni. Dintre *corticosteroizi* cel mai activ în infecțiile cu HSV, *in vitro,* s-a dovedit a fi *dexametazona* (pentru HSV-1), urmată în ordinea eficacității de *prednisolon, hidrocortizon, progesteron. In vivo,* dexametazona se recomandă doar în keratoconjunctivite epidemice, în asociere cu vidarabina. *Insulina* (4 U/mL) inhibă sinteza ADN-HSV, în culturi de limfoblastoide transformate de virusul Epstein-Barr. *Extractul total de timus,* ca atare sau în asociație cu extracte totale sau parțiale de lipide și proteine timice, stimulează răspunsul imun la șoarecii infectați cu VG (V. T. Babeș și colab., 1973).

Derivate lactate. Laptele uman degresat inactivează virusul urlian în lichidul alantoidian al ouălor embrionate de găină (Copelovici și colab., 1983). Laptele fiert și, în special, iaurtul fiert total și cel centrifugat au o marcantă acțiune virulicidă asupra VG A/PR/8. De asemenea, iaurtul și derivații săi acționează ca agenți anti-VG la șoarecii infectați experimental, reducînd mortalitatea, titrul HA din plămînii șoarecilor infectați și tratați și mărind DMS (Eșanu și colab., 1986).

Ig cu specificitate antivirală sînt utile la bolnavii infectați cu virus urlian, prevenind complicațiile și reducînd durata bolii (Copelovici și colab., 1979). *Ig specifică anti-HSV* potențează acțiunea anti-VG a produsului Candiflor, asociată și cu Flumidin. Această Ig, asociată cu Flumidin, dă cele mai bune rezultate în keratita herpetică, urmată de herpesul mucocutanat și genital. De asemenea, este utilă în tratarea uveitelor (Athanasiu și colab., 1984). Ig specifică asociată cu Flumidin a dat rezultate promițătoare în tratarea cancerului cervical și a unor neoplasme nazofaringiene și laringiene de etiologie, posibil, virală (Epstein-Barr) (Nastac și colab., 1977). *Ig specifică antirujeolică* a îmbunătățit terapia sclerozei multiple la pacienți cu un titru foarte ridicat de anticorpi antirujeolici (Cajal și colab., 1973).

Ceruloplasmina — un inhibitor seric nespecific al virusurilor ce conțin glicoproteine în membrana lor — previne replicarea VG în ouăle embrionate infectate experimental. În experimente la iepuri, ceruloplasmina inoculată odată cu VG protejează total animalele. *Cafeina, amidopirina* și *acidul acetilsalicilic* — compuși ce au proprietatea de a mări concentrația ceruloplasminei în ser — determină un efect de protecție de 100%, 77%

şi, respectiv, 50%, care durează 24—48 de ore, după care mortalitatea creşte, chiar peste nivelul iniţial (Samuel şi colab., 1978 ; Tomas şi colab., 1979).

Diferiţi **acizi nucleici** celulari şi virali inhibă replicarea VG în culturi celulare (Derevici, Drăgănescu, 1959). Aceşti compuşi conferă o protecţie nespecifică la şoarecii inoculaţi cu VG, doza optimă (400 μg/şoarece) reducînd mortalitatea cu 20—30%. Tratarea cu acizi nucleici (ADN cromozomial, ARN total hepatic, ARNt, ARNr) a unor culturi celulare inoculate cu HSV reduce titrul infectant cu 1,75 log (Iliescu şi colab., 1983).

Rezultate promiţătoare s-au obţinut, la şoarecele nou-născut, cu **factorul de transfer** (FT) din limfocite omoloage sau din animale imune în infecţiile experimentale cu HSV, atît profilactic, cît şi terapeutic (Cernescu şi colab., 1982).

13.2.8. ALŢI COMPUŞI DE SINTEZĂ

Derivaţi ai *N-fenil-N′-aril-* sau *alchiltioureei* inhibă, în culturi celulare, replicarea unui număr de enterovirusuri : Coxsackie A şi B (A6, A7, B1, B3), polio, al febrei aftoase, encefalomiocarditic şi rhino. Aceşti compuşi au conferit protecţie şi şoarecilor nou-născuţi infectaţi cu virusuri Coxsackie (A6, A7, B1, B3) (Galabov şi colab., 1979). *N-fenil-N′-3-hidroxifeniltioureea* s-a dovedit, de asemenea, activă în culturi celulare, împotriva mai multor tulpini ale virusurilor Coxsackie B1-6, ECHO 1, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 17, 19, 20 (Galabov, 1978). *IOB-252,* un derivat de *nitrozouree,* cu activitate antitumorală, inhibă replicarea virusului vaccinal în culturi celulare (Sorodoc şi colab., 1977).

Dintre derivaţii *benzotiazolului* şi ai *benzotiazolintionei,* o bună activitate de inhibare, în culturi celulare, a arătat-o *3-(2-etiltio-6-benzotiazolilaminometil)-2-benzotiazolintiona* asupra virusurilor encefalomielitei ecvine vestice şi a bolii Newcastle (Rada şi colab., 1978).

2, 4, 6-triamino-pirimidil-5-azobenzenul inhibă replicarea HSV în culturi celulare, ca şi *2-amino-4(2, 3, şi 4-metiltioanilin)-triazinele, dimetildietilnitrozaminele, 2-mercapto-1-(β-4-piridiletil)benzimidazolul,* o serie de derivaţi ai *clorhidratului de furan,* unele cetone ciclice ca : *bis-amidinhidrazondicetona, benzo-1-chinolindicetona, 4-[4-[2-(metoxifenil)etinil]fenil]-metil-3, 5-heptandiona.* Arginina fiind necesară maturării HSV, s-au testat proprietăţile inhibitoare ale unor analogi ai acesteia, dintre care cel mai bun s-a dovedit *anhidro-bis-(β-hidroxietil)biguanidinclorhidratul (Flumidin ; Moroxidin ; Virugon)* singur sau cu Ig specifică anti-HSV şi Candiflor. Dintre fenilglicozizi se detaşează ca inhibitor al HSV *p-(sec-butil)fenil-6-Cl-6-dezoxi-β-D-glicopiranozidul.* Derivatul iodurat este activ şi în boala gripală. Derivatul *benzoil clorurat* al *dextransulfatului-500 (Dequonal)* are o acţiune virulicidă asupra HSV. *Acidul boric* şi *boratul de sodiu* inhibă HSV în culturi celulare şi dau rezultate satisfăcătoare în tratamentul local al unor forme de herpes mucocutanat.

Unii compuşi cu slabă activitate antivirală potenţează activitatea unor compuşi activi, cum este cazul, de exemplu, cu *d, l-noformicina, d, l-etionina, glioxalnitrofenil-4-N-p-dicloracetilanilinetoxidiacetatul* ş.a. care dau bune rezultate anti-VG în asociere cu amantadina. Alţi derivaţi cetoaldehidici mai simpli aù activitate comparabilă : *metil-, fenil-, bifenilglioxalul, bis-amidinohidrazona glioxalului, metilglioxalul.*

Derivaţii de bifenil — *xenaldial, xenalamina* — inactivează VG *in vitro* (A/PR/8/34-H_0N1, dar activitatea lor scade cînd se trece de la bifenil la fenil şi metil.

Este interesant de remarcat că unii *analogi nucleozidici,* cunoscuţi ca agenţi anti-HSV — *3-deazacitidina, 3-deazatimidina,* unii *derivaţi halogenaţi,* ca *5-F-uracil, 1-β-D-glucoribopiranozil-6-F-timidină* — sînt activi împotriva VG A şi B, ceea ce este mai rar. Printre inhibitorii VG de tip B se numără şi unii derivaţi triazolici, ca *3-metil-4-α-piridil-1, 2, 4-triazol-5-tiolul* şi *3, 4-dimetil-1, 2, 4-triazol-5-tiolul.*

Derivaţi ai benzo(b)tiofenului au efecte similare cu ale amantadinei atît ca activitate anti-VG, cît şi ca mecanism de acţiune.

Din *clasa epiditiodicetopiperazinelor, acetilaranotina* se remarcă ca un inhibitor selectiv al VG, *in vitro,* prin inhibarea ARNp. *Benzimidazolul* şi *benzamidina* se remarcă prin inhibarea VG, în culturi celulare şi la şoareci, fără a provoca fenomene toxice. Mai menţionăm ca posibili agenţi antivirali, în special antigripali, *alcoxibenzaldehidele* şi *alcoxicinamaldehidele, tiofosfamidele unor alcaloizi şi amine,* unii *carbamaţi, iodofori, amfoliţi, decaline, aminofenoli halogenaţi ş.a.* De notat acţiunea de reducere a titrului HA (din omogenat de plămîn) şi a ratei mortalităţii, ca şi a măririi DMS la şoarecii trataţi cu NaF înainte de infecţia experimentală la şoareci, cu VG A/PR/8 (Prahoveanu şi colab., 1982), precum şi a altor antimetaboliţi ca *malonatul de sodiu, acidul monoiodacetic* ş.a.

Bibliografie selectivă

BAUER D. J. — The Specific Treatment in Virus Diseases, MTT Press Ltd., Lancaster, 1977.

COLLIER L. H., OXFORD J. S. (red.) — Developments in Antiviral Chemotherapy, Academic Press Inc., New York, 1980.

FRAENKEL-CONRAT H., WAGNER R. R. (red.) — Comprehensive Virology, vol. IV, Plenum Press Inc., New York, 1975.

INDULEN M. K. (red.) — Mehanizmî antivirusnogo deistvia proizvodnîh adamantana, Abstr. Congr. Europ. Ass. against Virus Dis., München, 1979 ; Zinatne, Riga, 1981.

LAUFER M. A., BANG F. B., MARAMOROSCH K. (red.) — Comprehensive Virology, vol. XXII, Academic Press Inc. New York, 1978.

MELNICK J. L. (red.) — Monographs in Virology, vol. XI, Karger, Basel, 1971.

OXFORD J. S. — Chemoprophylaxis and Virus Infections of the Respiratory Tract, vol. I, CRC Press, 1977.

OXFORD J. S. (red.) — Chemotherapy of Herpes Simplex Virus Infections, Academic Press, New York, 1977.

SHUGAR D. (red.) — Viral Chemotherapy, vol. I, Pergamon Press Inc., New York, 1984.

14

Epidemiologie virală

14.1. INTRODUCERE

Obiectivele epidemiologiei virale sînt identificarea, explicarea și controlul fenomenelor morbide de masă induse de virusuri, al acțiunii factorilor implicați, în vederea prevenirii și combaterii acestor manifestări.

Domeniile esențiale ale epidemiologiei virale. Epidemiologia descriptivă virală redă evoluția, extensia, distribuția și gravitatea îmbolnăvirilor datorate unui agent patogen viral, într-o populație precizată, într-o anumită zonă geografică, într-un interval de timp determinat și în condiții de mediu specifice. Datele respective sînt colectate prin observarea directă a situației epidemiologice, prin investigații anamnestice clinice și paraclinice (de exemplu, prin screening-uni serologice) ; prelucrările acestor informații conduc la o serie de indicatori statistici, definind gradul de afectare a populației prin viroza respectivă.

Epidemiologia analitică virală formulează și validează ipoteze referitoare la determinismul proceselor (cauze, condiționări etc.), la mecanismele respective și la legăturile factorilor implicați, caracteristici ale fenomenelor morbide de masă induse de virusuri (de exemplu, legități deterministe sau statistice specificînd mediile multianuale, tendințele medii, ciclicitățile multianuale etc.).

Compararea evoluțiilor epidemiologice din diverse arii și perioade, din diferite condiții — grație similitudinilor sau diferențelor relevante constatate — permite precizarea unor concepte, formularea unor ipoteze.

Prin anchete retrospective sau prospective pe eșantioane largi, bine alese, utilizînd metodele riguroase ale statisticii multidimensionale, se testează ipotezele menționate.

Epidemiologia virală experimentală oferă date suplimentare prin studii pe diverse modele epidemiologice, privind modalitățile de acțiune și importanța epidemiologică a diverșilor factori (de risc sau protectori) ; ne referim, de exemplu, la studiul pe voluntari a eficienței diverselor măsuri preventive sau curative.

Coroborarea diverselor concluzii, integrarea diverselor legități, utilizarea metodelor matematice precizează cadrul teoretic explicativ general al epidemiologiei virale (metodologia, strategia etc.), precum și instrumentele acesteia (tehnicile utilizabile).

Relațiile epidemiologiei virale cu alte discipline. Epidemiologia virală este puternic legată de disciplinele ce studiază diversele aspecte particulare ale infecțiilor și epidemiilor virale (biologice sau sociale, fizice sau chimice) ; aceste discipline oferă epidemiologiei diverse concepte, metode, legități indispensabile sau le utilizează pe cele ale epidemiologiei virale.

Disciplinele medicale, umane și veterinare, sînt în mod natural cele mai implicate în dezvoltarea epidemiologiei virale (ne referim în special la microbiologie, virusologie, la studiul bolilor infecțioase etc.).

Medicina clinică este interesată în special de identificarea, explicarea și controlul evoluției stării de sănătate individuală ; ea procură epidemiologiei liste de entități morbide, forme de boală, markeri ai stării de sănătate, metode de influențare a acesteia. Epidemiologia virală utilizează aceste informații pentru a caracteriza fenomenele morbide de masă, în funcție de colectivitate, de mediul local etc. ; la rîndul ei, ea furnizează medicinii clinice date inedite, ipoteze, teste, metode utile în precizarea istoriei naturale, a etiopatogeniei bolii și a măsurilor terapeutice.

Igiena, organizarea sănătății publice sînt beneficiari direcți ce valorifică datele și legitățile obținute în cadrul epidemiologiei virale ; cunoscînd necesitățile și posibilitățile de control al proceselor morbide de etiologie virală se pot specifica măsurile de prevenire și combatere în cadrul unor programe antiepidemice utilizînd optim resursele disponibile ale rețelei.

Vom menționa că, în cazul practicii concrete antiepidemice antivirale, intervin mari dificultăți datorate :

— diversității situațiilor și mecanismelor epidemiologice care trebuie identificate, în condițiile unei simptomatologii adesea nespecifice ;

— mijloacelor de control, de diversitate și eficiență limitate (de exemplu, în cazul vaccinărilor nu există produse corespunzătoare împotriva tuturor agenților virali circulanți ; chiar dacă acestea ar exista ar apărea mereu noi contingente de persoane receptive ce trebuie vaccinate și de asemenea nu toți beneficiarii potențiali ar ajunge să fie vaccinați).

Disciplinele biologice umane, și în special ecologia, au mari implicații în epidemiologia virală ; de exemplu, ecologia oferă date despre interacțiunile biocenozelor între ele (în particular, populațiile umane) și cu biotopurile (mediile locale naturale și eventual sociale), despre integrarea și unitatea lor în cadrul ecosistemului. Ecologia procură și metode de descriere a acțiunii unor elemente ale ecosistemului asupra altora. Epidemiologia virală poate astfel urmări adecvat acțiunea asupra stării de sănătate (individuală și în special colectivă) a unor factori ai mediului. Aceștia pot fi nocivi (de risc, de agresiune, perturbatori) sau utili (protectori) ; factorii pot fi naturali sau artificiali (legați de intervențiile umane) ; ei pot fi determinanți (intervenind imediat, direct și adesea decisiv în producerea sau împiedicarea proceselor morbide de masă) ; alteori ei pot fi doar favorizanți sau defavorizanți (intervenind indirect și doar în modularea acțiunilor factorilor determinanți). Ecologia poate sugera metode de diminuare a efectelor negative ale factorilor de risc sau de amplificare a efectelor pozitive ale factorilor protectori.

Alte discipline consacrate studiului mediului natural (geografia, geologia, botanica, zoologia, fizica, chimia etc.) sau ale celui social (psihologia, demografia, economia, sociologia, istoria, filozofia etc.) pot servi descrierii și explicării unor fațete importante ale proceselor epidemiologice.

Disciplinele referitoare la stringerea, prelucrarea și valorificarea informațiilor (electronica, informatica, matematica și în special statistica matematică etc.) au o mare importanță în cadrul acțiunilor de formulare și validare a diverselor ipoteze epidemiologice.

Importanța epidemiologiei virale. Fenomenele morbide induse de virusuri pot implica mari pierderi materiale și umane (numeroase zile de incapacitate de muncă, uneori pensionări sau chiar decese, precum și reduceri ale veniturilor familiilor bolnavilor, suferințe asociate etc.). Ele reprezintă o formă particulară a influențelor negative generale pe care le are orice afectare serioasă a stării de sănătate a populației și mediului asupra dezvoltării colectivității (asupra productivității, nivelului economic, calității vieții etc.).

Interesele generale ale colectivităților cer deci un control continuu și riguros al stării de sănătate a populației și mediului, valorificarea indispensibilă și optimă a datelor epidemiologice în general (a celor virale în particular) pentru organizarea adecvată a programelor de prevenire și combatere a fenomenelor morbide de masă respective.

14.2. FENOMENE MORBIDE DE MASĂ INDUSE DE VIRUSURI

14.2.1. PROCESUL EPIDEMIOLOGIC VIRAL

Procesul epidemiologic constă în ansamblul fenomenelor biologice din masa populației și din mediul local (natural și social) implicate în determinismul și dinamica unor procese morbide de masă, ducînd la alterări caracteristice ale stării de sănătate și la perturbări ale vieții economice și sociale ale unei colectivități.

În evoluția fenomenelor de masă intervin — așa cum am mai arătat — factori indispensabili (determinanți) și alții mai mult sau mai puțin importanți în specificarea formei concrete de manifestare a procesului epidemiologic (factori favorizanți — defavorizanți).

1) Factorii determinanți. Participă la generarea, transferul și recepționarea unor factori tipici de agresiune (în speță agenții patogeni virali) — esențiali în producerea bolii.

Ei sînt verigi ale unui lanț epidemiologic (fig. 14-1), grație căruia se efectuează propagarea virozelor (prin transmiterea virusului de la un bolnav spre o altă persoană care, în anumite condiții, după contaminare, poate contracta boala).

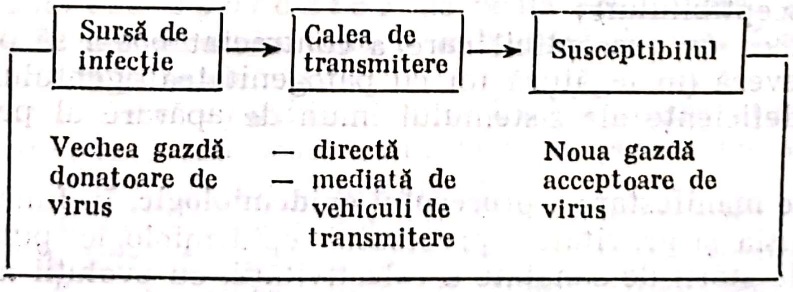

Sursă de infecție
Calea de transmitere
Susceptibilul
Vechea gazdă donatoare de virus
— directă
— mediată de vehiculi de transmitere
Noua gazdă acceptoare de virus

Fig. 14-1 — Verigile lanțului epidemiologic.

Donatorul — rezervorul de virus — este sursa de infecţie ; ne referim la un organism bolnav sau purtător aparent sănătos de virus ce conţine, multiplică şi elimină printr-o anumită „poartă de ieşire" agentul patogen, difuzîndu-l.

Intermediarul — mediatorul — este calea de transmitere prin mediul exterior (între sursa de infecţie şi viitorul bolnav) prin contact direct sau mediat (de suporturi inerte sau vii — vehiculii de transmitere).

Acceptorul — receptorul de virus — este noua gazdă în curs de îmbolnăvire (invadată de virus printr-o „poartă de intrare" tipică). Îmbolnăvirea are loc doar dacă acceptorul nu are o rezistenţă naturală sau dobîndită (printr-o trecere anterioară prin boală), deci doar dacă este susceptibil, receptiv.

2. *Factorii favorizanţi — defavorizanţi.* Caracteristicile factorilor determinanţi, probabilitatea grupării lor în lanţuri concrete — eficiente în transmiterea virusului — sînt influenţate de mulţi factori, favorizanţi sau defavorizanţi ai propagării virozelor ; ne referim la diverşi factori fizici (cosmici, climatici şi geografici), chimici, biologici (floră, faună etc.), economici şi sociali etc.

În aceste condiţii, procesul epidemiologic are un determinism complex, multifactorial, de tip statistic (în care intervin uneori legături cauzale, alteori — evoluţii dominate de hazard).

Factorii menţionaţi pot fi grupaţi în niveluri referitoare la individ, la populaţie, la cadrul natural şi social de viaţă ; ei intră în diverse relaţii (de sinergism, antagonism) şi se grupează în diverse structuri caracteristice nivelurilor.

Implicaţiile diverşilor factori asupra procesului epidemiologic pot fi clasificate numai prin largi şi detaliate anchete.

Intensitatea, amploarea şi gravitatea procesului epidemiologic depind de o serie de caracteristici ale virusului şi ale verigilor lanţului epidemiologic (modulate, după cum am mai menţionat, de intervenţiile celorlalţi factori favorizanţi sau defavorizanţi).

Ca verigi ale lanţului epidemiologic, factorii determinanţi pot fi caracterizaţi de o serie de atribute legate de :

— gradul de expunere a susceptibililor şi vehiculilor de transmitere la contacte contaminante ;

— riscul de menţinere a contagiozităţii surselor de infecţie şi a contaminării vehiculilor de transmitere ;

— riscul de diseminare a agenţilor patogeni de către sursele de infecţie şi de către vehiculii de transmitere contaminanţi ;

— riscul ca un susceptibil, căruia i s-a transmis virusul, să contacteze efectiv boala (legat de virulenţa virusului, de contagiozitatea bolii şi de rezistenţa susceptibilului) ;

— riscul ca un susceptibil care a contractat boala să o facă într-o formă mai severă (în legătură tot cu patogenitatea agentului viral şi cu eventualele deficienţe ale sistemului imun de apărare al persoanei respective).

Forme de manifestare a procesului epidemiologic. În funcţie de intensitatea, extensia şi gravitatea procesului epidemiologic putem distinge modificări ale stării de sănătate a colectivităţii, cu evoluţii mai mult sau mai puţin severe, datorită unor fenomene morbide de masă specifice.

a) Epidemiile. Cînd factorii determinanţi şi cei favorizanţi concurează şi asigură condiţiile unei ample şi rapide propagări a virozelor, procesul epidemiologic are un caracter epidemic.

Îmbolnăvirile sînt frecvente, dense, afectează o parte importantă a colectivităţii ; se întîlnesc adesea evoluţii mai severe şi intervin perturbări importante în viaţa economică şi socială a colectivităţii.

Epidemiile datorate contactelor interumane directe pot debuta lent, insidios, avînd diverse durate, stingîndu-se cînd proporţia de receptivi scade sub un anumit prag (sau cînd cea de persoane imunizate prin îmbolnăviri clinice, subclinice sau prin vaccinări, depăşeşte un prag — situaţie denumită în literatura anglo-saxonă *„hard immunity"*). Ulterior, masa receptivă creşte pe seama noilor susceptibili, pregătindu-se condiţiile declanşării unor noi epidemii. Uneori acest gen de epidemii durează mai puţin, survenind în anumite perioade ale anului, în care intervin mai mulţi factori favorizanţi ; ne referim la epidemiile sezoniere (în sezonul cald, de exemplu, apar epidemii prin infecţii virale digestive sau cele produse de vectori ; în sezonul rece apar epidemii datorate virozelor respiratorii).

Forma extremă a epidemiilor datorate contactelor interumane este pandemia, ce afectează ţări şi continente cuprinzînd o mare parte din populaţie, înregistrîndu-se cazuri de o severitate deosebită, mari perturbări socio-economice etc. ; este cazul pandemiilor prin gripă de tip A ce intervin la 10—15 ani ; acestea survin prin modificări genetice radicale ale virusului, populaţia neavînd imunitate faţă de noile tulpini apărute ce prezintă o virulenţă şi o contagiozitate sporite.

O altă formă de manifestare a procesului epidemiologic este epidemia ocazională locală, cu un debut exploziv, cu multe îmbolnăviri concentrate într-un mic interval de timp ; mulţi receptivi sînt contaminaţi prin acelaşi mecanism de transmitere (de exemplu, de la puncte de distribuire cu apă infectată sau cu alimente contaminate etc.).

b) Endemiile. Cînd masele receptive sînt mai mici (din cauza imunizărilor naturale — a trecerii prin boală — sau a celor artificiale — prin vaccinare) iar difuzibilitatea maselor de agenţi patogeni virali este mai redusă, frecvenţa, densitatea şi severitatea îmbolnăvirilor sînt mai mici ; cazurile, în această situaţie, nu sînt însă prea distanţate în timp şi în spaţiu ; procesul epidemiologic este de tip endemic.

Adesea, în cazul virozelor, procesul epidemiologic are un caracter mixt, endemo-epidemic ; el are o ciclicitate multianuală, cu perioade şi amplitudini dependente de tipul infecţiei virale şi de colectivitatea respectivă ; după cîţiva ani „epidemici" survin cîţiva ani „interepidemici" — „endemici".

c) Cazurile sporadice de boală apar pentru mase receptive şi difuzibilităţi ale virusului mici ; îmbolnăvirile sînt foarte rare, fără legătură aparentă între ele.

d) Starea de eradicare a bolii apare atunci cînd prin vaccinare sistematică sau boală naturală toate persoanele sînt imunizate, deci infecţia virală nu se mai poate propaga.

e) O altă situaţie este aceea a *bolilor de import,* ce apar pentru prima dată într-un teritoriu datorită unei surse de infecţie „importate". Uneori ele pot ocaziona epidemii severe. Alteori ele pot reprezenta adevărate probleme de sănătate publică, atunci cînd evoluția lor este endemică sau chiar în cazuri sporadice (SIDA).

O bună cunoaștere a procesului epidemiologic, a variantelor sale posibile, a factorilor determinanți și favorizanți este indispensabilă pentru adoptarea unei conduite raționale, ținînd cont de existența unui risc crescut de evoluție epidemică (se pot identifica necesitățile de prestații antiepidemice, resursele necesare, condițiile de organizare optimă a eforturilor preventive și curative). În primul rînd, extrapolarea vechilor tendințe de morbiditate a unor afecțiuni și cunoașterea ciclicităților lor multianuale etc. pot determina prognozări realiste — baza unor programe antiepidemice raționale. Cunoașterea morbidității probabile în viitorul imediat permite alocarea resurselor necesare, pregătirea acțiunilor de combatere a unei viroze de o amploare corect estimată, crescînd eficiența prestațiilor preventive și curative respective.

14.2.2. PROCESUL INFECȚIOS

Aspecte etiopatogenice. Procesul infecțios rezultat din acțiunea agentului viral asupra organismului receptiv (aflat în anumite relații cu mediul înconjurător) este o componentă importantă a procesului epidemiologic. Nu întotdeauna infecția, care indică pătrunderea și replicarea virusului în organism, înseamnă și boală ; aceasta din urmă reprezintă răspunsul organismului la o infecție suficient de severă pentru a induce manifestări clinice ; pentru multe virusuri este comună o infecție neurmată de boală.

Prima fază a procesului infecțios este invadarea organismului prin „poarta de intrare" (respiratorie, digestivă, cutanată, genitală, sanguină). Virusul poate pătrunde prin aceste căi cu ocazia schimburilor fiziologice cu exteriorul (prin respirație, alimentație etc.) sau accidental.

Invadarea este posibilă doar dacă agentul viral poate depăși barierele protectoare ale porții de intrare ; intervin în primul rînd barierele fizico-chimice (zone cu temperaturi, pH și concentrații de săruri inactivante, mișcări ale unor suporturi — cili, mucus) ; în al doilea rînd intervin barierele biologice : elemente ale sistemelor de apărare nespecifice sau specifice — imunitare (anticorpi secretori sau umorali, macrofage, interferon etc.). Virusul traversează aceste zone dacă poate evita sau combate antagoniștii menționați, de exemplu grație unor componente precum neuraminidaza capsidală ce anihilează inhibitorii nespecifici din mucus. Invadarea poate fi încununată de succes numai dacă sînt respectate și alte condiții, și anume să existe un tropism al virusului pentru țesutul respectiv, virusul să aibă posibilitatea de a se fixa pe receptorii celulelor respective sau să poată pătrunde în aceste celule și să se poată replica acolo.

În unele cazuri, chiar țesutul inițial invadat, sediul primar, este locul unde are loc infecția locală principală (sursa manifestărilor clinice), reprezentînd țesutul-țintă ; este cazul virozelor respiratorii curente, al celor digestive datorate rotavirusurilor.

În alte cazuri, după infectarea sediului primar are loc o diseminare a virusului (viremie) spre alte organe (sedii secundare, terțiare), ce reprezintă țesuturile sau organele-țintă.

Căile de legătură (sanguine, limfatice, nervoase) diseminează virusul, care poate circula liber, cuplat cu anticorpii (în complexele imune circulante) sau înglobat în celulele sanguine (uneori, ele însele definind țesutul-țintă în care virusul se replică).

În cazul hepatitelor virale țesutul-țintă secundar — ficatul — este atins ca urmare a unei viremii primare ; în cazul infecțiilor cutanate sau ale sistemului nervos central țesuturile-țintă respective sînt atinse după viremie și diseminare secundară. Aceste țesuturi-țintă (ficatul în hepatită și sistemul nervos central în neuroviroze) sînt cele pentru care tropismul și citopatogenitatea virusului sînt maxime ; la acest nivel, leziunile locale eliberează suficiente produse de degradare (detritusuri) capabile să producă simptomatologia specifică virozei (de exemplu, febră).

În cazurile în care există țesuturi-țintă secundare, terțiare etc., îmbolnăvirile sînt mai severe, întreg organismul este mai mult sau mai puțin afectat, sistemicitatea infecției este mai mare.

Ultima etapă a traseului virusului în organism este traversarea „porții de ieșire“ (ce coincide sau nu cu cea de intrare) ; virusul este legat de anumite suporturi sub forma diverselor produse patogene.

Preliminar, intervin eliberări ale virusului din celule (cu liza acestora, dacă virusul este legat de ele) ; ieșirea spre porțile de eliminare se face traversînd barierele protectoare menționate, în sensul opus celui din cazul invadării organismului prin poarta respectivă.

Difuzarea în exterior a produselor patogene este urmarea unor acte fiziologice, a unor manevre medicale etc. Prin căile respiratorii — nas, gură — se elimină secreții nazofaringiene, spută, salivă infectante, adesea în forma unor aerosoli ; la nivelul pielii, virusul este eliminat prin serozități, puroi, vezicule, cruste, descuamări (în cazul variolei) etc. Virusul poate fi eliminat și prin aparatul urogenital (prin urină sau prin spermă și secreții vaginale) sau pe cale digestivă (enterovirusuri, rotavirusuri) ; placenta permite uneori contaminarea produsului de concepție (ca în cazul rubeolei); glandele mamare elimină virus prin lapte (CMV) ; sîngele poate fi și el contaminat în cazul hepatitei virale de tip B, SIDA.

Fazele infecției virale și contagiozitatea bolnavului în perioadele respective. Prima fază a bolii este perioada de incubație, delimitată de momentul contaminării și respectiv de momentul atingerii și afectării țesutului-țintă.

Următoarea fază este cea de invazie esențială, în care virusul se replică intensiv, începînd să producă alterări structurale și funcționale manifeste, mai mult sau mai puțin specifice.

În faza de stare se produc alterări și detritusuri celulare exprimate prin simptomatologia caracteristică virozei respective.

Faza de convalescență duce adesea la sterilizarea organismului, la vindecare. În cazul unei reacții imune deficitare convalescența se poate prelungi, virusul poate persista în organism și poate interveni o fază de cronicizare a bolii sau de purtător (aparent sănătos) de virus. Uneori se poate produce o agravare extremă a stării — faza de evoluție letală. Ultimele faze intervin, deci, doar în unele cazuri de organisme tarate, cu sistemul de apărare imun mai mult sau mai puțin ineficient.

Contagiozitatea unui bolnav se datorește produselor patogene eliminate de el ; ea poate fi de scurtă durată și corespunde, în general, sfîrșitului perioadei de incubație, perioadei de invazie (în cazul rujeolei), perioadei de stare (în cazul majorității virozelor) sau chiar începutului perioadei de convalescență (în cazul hepatitei virale de tip B). Contagiozitatea poate fi de lungă durată, în cazul cronicizării bolii sau a stării de purtător cronic (hepatita virală de tip B).

14.2.3. MODALITĂȚI EVOLUTIVE SPECIFICE VIROZELOR

Organismul infectat are un număr redus de răspunsuri la agresiunea virală ; sindromul (tabloul clinic) produs nu permite adesea stabilirea unui diagnostic cert, fără investiții specifice suplimentare, de exemplu utilizarea unor teste moderne de diagnostic rapid (izolarea și identificarea virusurilor, stabilirea unor seroconversii semnificative etc.). Fără aceste investigații putem asocia doar cu o anumită probabilitate un diagnostic unui anumit sindrom (mai ales că unei viroze îi pot corespunde diferite tablouri clinice) ; manifestările clinice depind de caracteristicile biologice individuale (de exemplu, de vîrstă), de condițiile de mediu (de exemplu, de sezon), de tulpinile virale circulante etc.

Pentru un anumit tip de răspuns clinic severitatea acestuia depinde de „poarta de intrare“, de patogenitatea (virulența și citopatogenitatea) virusului și de imunogenitatea acestuia, de capacitatea lui de a induce (și eventual de a combate) reacțiile imune specifice ale gazdei. De asemenea poate fi vorba de eficiența reacției imune de apărare a gazdei, care limitează replicarea și persistența agenților patogeni virali din organismul infectat ; aceasta depinde de vîrstă, de nivelul preexistent al imunității, de intensitatea răspunsului imun, de factorii genetici implicați, de bolile concomitente din antecedente, de factori nutriționali sau habitudinali (fumat, alcool etc.), de factori psihologici (stres, atitudine față de boală) etc.

În general, modalitățile evolutive ale infecției virale pot fi intuitiv grupate și prezentate printr-o piramidă (aspect de *„iceberg“*) (fig. 14-2) ; bazei acesteia i se asociază evoluțiile mai ușoare, uneori inaparente, care sînt și mai frecvente ; vîrfului piramidei îi corespund evoluțiile mai severe și mai rare. În lista de modalități evolutive nu ne oprim asupra expunerilor fără infecție (în care virusul nu a reușit să pătrundă în organism, să se fixeze pe țesuturile expuse — din zona „porții de intrare“).

— Prima entitate de pe lista menționată este infecția asimptomatică, fără boală clinic manifestă ; ea poate corespunde unei replicări virale, fără maturarea completă a noilor virioni sau fără o perturbare notabilă

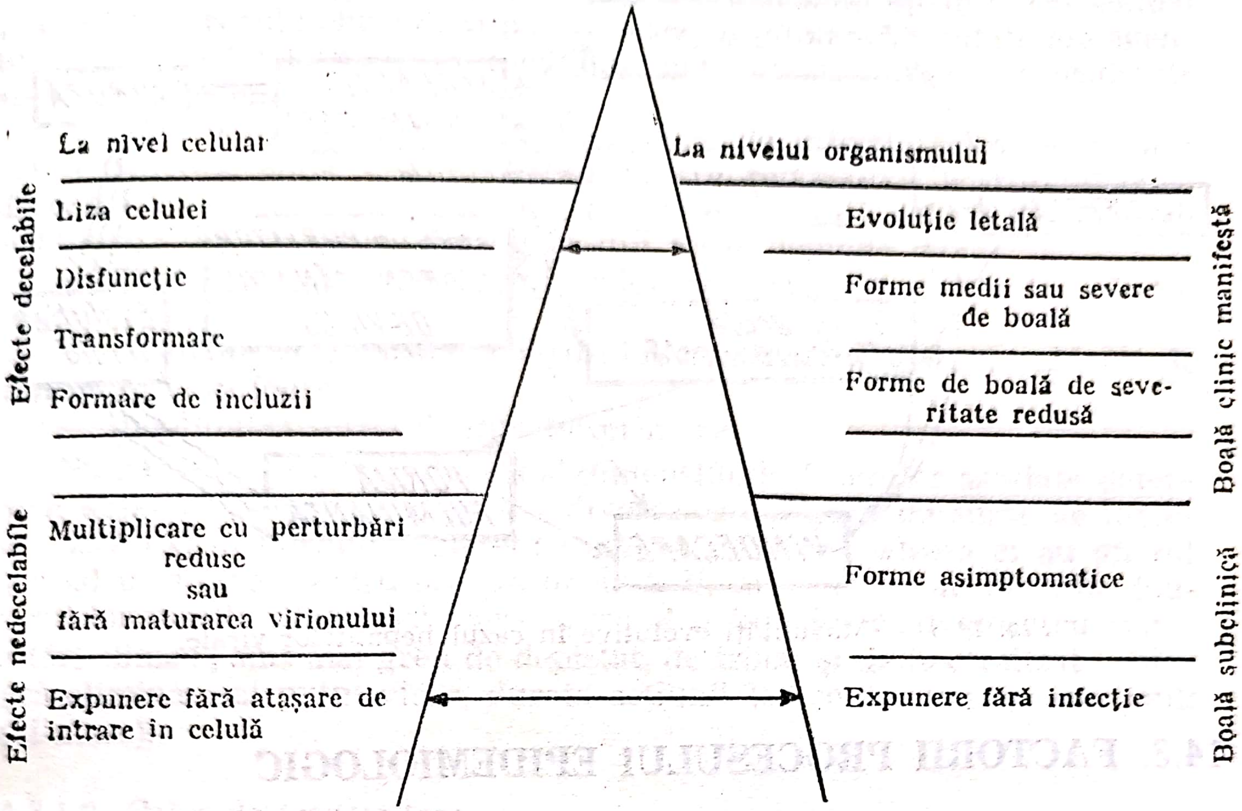

La nivel celular
La nivelul organismului
Efecte decelabile
Liza celulei
Disfuncţie
Transformare
Formare de incluzii
Efecte nedecelabile
Multiplicare cu perturbări reduse sau fără maturarea virionului
Expunere fără ataşare de intrare în celulă
Evoluţie letală
Forme medii sau severe de boală
Forme de boală de severitate redusă
Boală clinic manifestă
Forme asimptomatice
Expunere fără infecţie
Boală subclinică

Fig. 14-2 — Reprezentarea în „*iceberg*" a tipurilor de răspuns faţă de agresiunea virală (după A. Evans). *Săgeţile* reprezintă, din punct de vedere calitativ, frecvenţa răspunsurilor faţă de agresiunea virală.

a gazdei (cazul virusurilor Papova). În aceste cazuri, virusurile pot persista mai mult timp în organism ; dacă apar depresii imunitare, infecţia latentă se poate activa, ducînd uneori la evoluţii severe.

— Pe o a doua poziţie în lista menţionată plasăm infecţiile acute simptomatice de severitate moderată (cu evoluţie în copilărie) şi care pot fi severe în cazul îmbolnăvirilor adulţilor (de exemplu, poliomielita).

— Următoarea formă evolutivă de pe listă este infecţia acută, simptomatică (în 100% din cazuri), de o severitate deosebită (adesea letală, uneori cu o evoluţie fulminantă) ; ea corespunde unor necroze tisulare masive, în absenţa unui răspuns imun adecvat, în cazul unor depresii imunitare (de exemplu, unele febre hemoragice).

— Alte forme evolutive posibile sînt infecţiile prelungite în care virusul poate conduce la transformări celulare, la depozite intracelulare (incluzii, etc.). În cazul infecţiilor prelungite asimptomatice avem de-a face cu o vindecare tardivă sau cu o stare de purtător sănătos. În cazul infecţiilor prelungite simptomatice putem întîlni cronicizări (stabilizate-inactive sau destabilizate-active) ; în cazul hepatitei virale de tip B vindecarea poate surveni după 8—24 de luni, cronicizarea putîndu-se instala după 6—12 luni. În ultimul caz se poate ajunge la transformări cirotice sau maligne şi chiar la evoluţii letale (fig. 14-3).

Scăderea şi mai mare a eficienţei reacţiei imune poate reactiva boala (eventual ciclic — ca în cazul virusurilor herpetice).

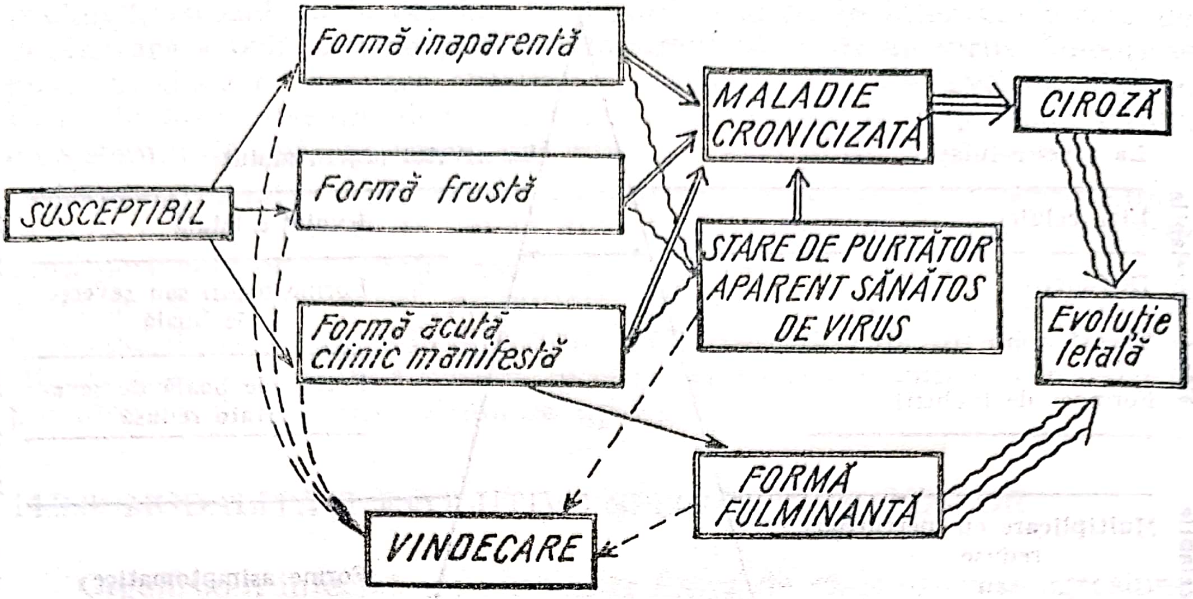

Formă inaparentă
MALADIE CRONICIZATĂ
CIROZĂ
SUSCEPTIBIL
Formă frustă
STARE DE PURTĂTOR APARENT SĂNĂTOS DE VIRUS
Evoluție letală
Formă acută clinic manifestă
FORMĂ FULMINANTĂ
VINDECARE

Fig. 14-3 — Modalități evolutive în cazul hepatitelor virale.

14.3. FACTORII PROCESULUI EPIDEMIOLOGIC

14.3.1. FACTORII DETERMINANȚI

14.3.1.1. *Sursa de infecție*

Rezervorul de virus este prima verigă a lanțului epidemiologic, în care agentul infecțios se replică și se menține un timp mai scurt sau mai lung și care, prin diferite căi, elimină virusul spre exterior.

Sursa de infecție este reprezentată de organismul uman (în antroponoze), și anume :

— bolnavul în diferite stadii de evoluție a bolii : în perioada de incubație (unele viroze respiratorii), în perioada de invazie (oreionul, rujeola etc.), în perioada de stare (toate afecțiunile virale), în convalescență (enteroviroze) ;

— purtătorul aparent sănătos care elimină virusul ;

— după vindecare și imunizare în urma unei contaminări accidentale (în cazul virusurilor enterice) ;

— în formele inaparente (atipice, abortive, fruste) de boală (în cazul virusurilor rubeolic sau urlian) ;

— bolnavul cronic, după aparenta vindecare a unui episod acut anterior cu sterilizare incompletă ;

— organismul tarat, cu deficite imunitare sau alte procese patologice.

Alteori sursa de infecție poate fi organismul animal (zoonoze) :

— mamifere domestice (câini) sau sălbatice (rozătoare, lup, vulpe etc). implicate în transmiterea virusurilor rabic, al febrei aftoase etc. ;

— păsări, care difuzează virusuri encefalitice, paragripale ;

— pești, moluște, care difuzează virusuri hepatitice ;

— artropode (țînțari, păduchi), care difuzează virusuri encefalitice.

În unele cazuri (în antropozoonoze) și organismul uman și cel animal pot difuza virusul ; chiar dacă pot avea loc multiplicări limitate ale agentului viral în unele părți ale mediului inert, acestea nu sînt considerate surse de infecție.

Zona contaminată din jurul unei surse de infecție primare în care pot fi generate surse de infecție secundare reprezintă focarul infecțios (în cazul zoonozelor este vorba de focalitate naturală, legată de anumite biotopuri) ; dimensiunile, durata acestui focar depinde de :

— durata și amploarea eliminărilor de virus ale sursei de infecție primare ;

— virulența și persistența virusului eliminat pe diverși vehiculi de transmitere din focar ;

— mobilitatea sursei de infecție primare.

Numărul (densitatea), durata și dimensiunile focarelor asociate determină importanța epidemiologică a diverselor categorii de surse de infecție ; dacă există purtători aparent sănătoși de virus, adesea ei au un rol esențial în difuzarea virusului în unele boli, ca de exemplu hepatita (numărul lor este frecvent mai mare ca cel al bolnavilor contagioși, cu manifestări clinice ; sînt mai greu de depistat, de izolat și de neutralizat ; chiar dacă elimină mai puțin virus, durata acțiunii lor contaminante este mult mai mare).

14.3.1.2. *Calea de transmitere*

Este a doua verigă a lanțului epidemiologic, indispensabilă în diseminarea și supraviețuirea virusului eliminat de rezervor și care trebuie să treacă și să se replice pe alte organisme susceptibile înaintea vindecării și sterilizării organismului-gazdă donator.

Căile de transmitere se pot clasifica după mai multe criterii.

O clasificare importantă este în funcție de modul de transmitere, care poate fi :

— direct de la produsele patogene eliminate de sursa de infecție, adică prin : contact fizic (piele-piele, contact sexual, sărut, mușcătură, lucrare dentară, mîini murdare) ; transfer hematogen (administrări de sînge sau derivate, uteroplacentar etc.) ; aerosolii răspîndiți din tractul respirator al organismului donator (prin strănut, tuse, vorbire) și eventual resuspendați în aer (cu ocazia curățeniei) ;

— indirect, în prezența unor vehiculi de transmitere unici sau grupați într-o „ștafetă“ transmițătoare de virus, ce pot fi reprezentați de obiecte inerte din mediul exterior sau ființe vii (vectori).

În funcție de specificul „porții de intrare“, căile de transmitere pot fi :

1. Căile de transmitere cu „porți de intrare“ respiratorii sînt cele mai frecvente. Este cazul virusurilor mai mult sau mai puțin rezistente la condițiile din aer, care este mediul exterior traversat (în special la desicarea aerosolilor ce conțin virusurile).

Dacă reovirusurile, EBV sînt foarte puțin rezistente iar virusurile adeno și enterice sînt dintre cele mai rezistente din această categorie, virusurile gripale, urlian și rujeolic au o rezistență limitată intermediară.

Uneori, „poarta de ieșire“ nu este cea respiratorie (de exemplu, este cea digestivă, în cazul virusurilor enterice). Produsele patogene prin care sînt difuzate virusurile menționate ajunse la „poarta de intrare“ respiratorie sînt aerosolii — picăturile Flügge — conținînd secreții nazofaringiene sau bronșice sau nucleii de picături și particulele uscate (rezultînd din uscarea parțială sau completă a picăturilor amintite).

Durata de suspendare crește rapid cînd diametrul (∅) scade (de la 10 s pentru $\varnothing \simeq 100\,\mu$, la 17 min pentru $\varnothing \simeq 10\,\mu$).

Transmiterea directă se face în special prin aerosolii menționați prin contact fizic.

Transmiterea indirectă se face cu ajutorul batistelor, recipientelor. Ajungînd la poarta de intrare respiratorie, este suficient ca pe mucoasele respective să se fixeze un număr redus de virioni pentru ca infecția să poată fi indusă (pentru diametre mai mari fixarea virusului se face de obicei pe mucoasa nazală ; pentru diametre mai mici — pe căile respiratorii superioare și inferioare).

În cazul unora dintre virusurile transmise pe cale respiratorie, țesutul-țintă este sediul primar afectat („poarta de intrare“) ; în alte cazuri pot fi afectate secundar diferite organe (ca de exemplu viscerele, în cazul gripei).

În cazul virusurilor enterice sau adeno țesutul-țintă poate fi sistemul nervos central ; în rujeolă, rubeolă etc. pot interveni afectări cutanate.

2. În cazul altei „porți de intrare“ frecvent implicate — cea digestivă —, virusurile respective trebuie să fie suficient de rezistente la enzime, pH și la condițiile din tubul digestiv ale cărui mucoase reprezintă țesuturile-țintă respective. Produsele patogene corespunzătoare sînt vărsăturile, dejecțiile etc. Transmitera directă se face de obicei pe calea fecal-orală prin mîinile murdare ; cea indirectă — prin diverși vehiculi : sol, apă, aer, obiecte personale, termometre, alimente, animale contaminate, vectori.

Fixarea virusului se poate face : în faringe, pe mucoasa intestinală (în cazul rotavirusurilor și virusurilor enterice), în ganglionii limfatici de la nivelul tubului digestiv (în cazul virusurilor adeno).

Țesutul-țintă poate fi : mucoasa intestinală în cazul rotavirusurilor, ficatul în cazul virusurilor hepatitice, sistemul nervos central în cazul virusurilor enterice.

3. În cazul „porții de intrare“ cutanate, și ea destul de des activă, produsele patogene diverse pot proveni de la variate „porți de ieșire“ :

— cutanate (de exemplu, vezicule, cruste în cazul transmiterii directe a virusurilor herpetice, variolic, varicella-zoster, Papova) ;

— orale (saliva) (de exemplu, cu ocazia unei mușcături, difuzînd virusul rabic) ;

— sanguine (de exemplu, prin manevre parenterale sau înțepături de insecte se transmit indirect HBV, CMV, HIV, EBV, arbovirusuri, virusuri enterice, ale febrelor exotice etc.).

Virusul poate pătrunde în organism și prin discontinuitățile cutanate (produse de diverse leziuni).

Mușcăturile pot favoriza la rîndul lor penetrarea virusului, ce poate fi ulterior diseminat și pe cale nervoasă spre sistemul nervos central (virusul rabic).

4. O altă „poartă de intrare“ este cea genitală, produsele patogene fiind sperma sau secrețiile vaginale, difuzînd HSV, HBV, HIV etc. ; ocazia transmiterii este contactul sexual sau nașterea (în ultimul caz putînd fi indusă o infecție neonatală).

Și în acest caz virusul pătrunde prin leziunile de pe organele genitale. Accidental (în cazul unor practici sexuale neuzuale), virusurile menționate pot pătrunde în organism și pe alte „porți de intrare“. „Poarta de intrare“ genitală, dar și cea digestivă (orală) sau cutanată pot servi la pătrunderea virusului eliminat prin „poarta de ieșire“ urinară (vom exemplifica : virusurile citomegalic, herpes simplex etc.).

5. O altă cale de transmitere a virusului este cea intrauterină sau transplancentară ; virusul diseminat pe cale hematogenă prin placentă induce o infecție intrauterină și apoi congenitală (hepatită, rubeolă, cu virus citomegalic etc.) ; aceste infecții conduc la diferite perturbări ale sarcinii și produsului de concepție.

Un rol important în diseminarea multor maladii virale îl au vehiculii de transmitere.

a) În primul rînd vom menționa elemente ale mediilor naturale — solul, apa și aerul — cu care omul vine în contact direct sau indirect, în timpul activităților sale zilnice.

Mediile naturale menționate pot fi contaminate :

— direct de la organismele bolnave (prin produse eliminate de tractul lor respirator, digestiv etc.) sau de la cadavrele animalelor bolnave ;

— indirect, în special de la reziduurile colectivităților cu multe surse de infecție (ape reziduale, îngrășăminte de animale) sau prin împrăștierea unor porțiuni ale mediilor naturale contaminate (prin curenții de aer, apa meteorică etc.).

Virusul poate supraviețui destul de mult în mediile amintite (de exemplu, virusurile adeno, enterice, hepatitice — în apa reziduală infectată. În aceste condiții mediile amintite pot avea o implicație importantă în contaminarea culturilor vegetale, a animalelor domestice, a obiectelor din gospodărie sau de la locul de muncă sau chiar direct a organismului susceptibil.

b) În al doilea rînd ne vom referi la anumite produse larg distribuite pe diverse rețele : alimente, apa potabilă, aerul condiționat etc.

Ele pot fi contaminate direct de la mîinile murdare, aerosoli sau dejecții, dar și indirect — de diverse medii contaminate, vectori etc. În cazul alimentelor contaminate, ocaziile de transmitere sînt multiple : în timpul preluării materiilor prime contaminate, a prelucrării lor, a depozitării și conservării alimentelor sau, ulterior, în timpul transportului, difuzării și consumului lor. Apa potabilă și aerul condiționat, cînd sînt contaminate determină în zona de utilizare a rețelei respective epidemii ocazionale ample, cu caracter exploziv. Aceasta cu atît mai mult cu cît durata de supraviețuire a virusului poate fi apreciabilă : zeci de zile în apa potabilă distribuită sau în unele alimente (în cazul virusurilor hepatice, adeno, variolic, ale febrei aftoase).

c) În al treilea rînd ne referim la o serie de obiecte comune care, fiind contaminate, transmit virusul în timpul folosirii lor. Acestea pot fi :

— obiecte individuale de uz curent care pot fi utilizate accidental și de alte persoane decît persoana-sursă de infecție sau pot contamina alți vehiculi de transmitere (aceste obiecte pot fi batiste, prosoape, lenjerie, îmbrăcăminte, încălţăminte etc.) ;

— obiecte frecvent contactate în casă şi la locul de muncă şi care, odată contaminate, pot transmite virusul şi celorlalţi utilizatori sau contaminează alţi vehiculi de transmitere (cărţi, jucării, mobilier, băi, telefon, veselă, clanţă, bani etc.) ;

— instrumentar sau alte materiale folosite în unităţi medicale cu pacienţi-surse de infecţie, ce contaminează obiectele respective.

Durata de contaminare a obiectelor comune este în general mai redusă decît în cazurile anterior discutate.

d) În sfîrşit, şi unele fiinţe vii — vectorii — pot transmite boala. Cînd virusul nu se replică în organismele respective, vectorul este pasiv (cazul muştelor, gîndacilor, furnicilor etc.). Dacă replicarea este posibilă, vectorul este activ (cazul ţînţarilor, căpuşelor, flebotomilor).

Spre deosebire de vectorii pasivi, în cazul celor activi transmiterea virusului se poate face şi altfel decît prin contactarea suprafeţei contaminate a corpului vectorului, şi anume prin contactul cu :

— dejecţiile vectorului ;

— saliva vectorului (cu ocazia înţepăturii susceptibilului de către vectorul-insectă) ;

— hemolimfa insectei-vector (strivită).

Eficienţa vehiculilor de transmitere în propagarea virozelor depinde de :

— numărul (densitatea) acestor suporturi intermediare de virus ;

— cantităţile de virus eliminate, durata de eliminare, aria focarului pe care se împrăştie ;

— adezivitatea produselor patogene de vehiculii contaminaţi, în funcţie de cantităţile medii de virus fixate pe aceste suporturi ;

— persistenţa virusului pe vehiculii analizaţi (rezistenţa la factorii fizici, chimici, biologici, inactivanţi din mediul extern, care acţionează asupra acestor suporturi ; ne referim la temperatură, umiditate, substanţe chimice, elemente imune, floră microbiană etc.) ;

— accesibilitatea vehiculului la „poarta de intrare“ a susceptibilului ;

— dificultăţile de depistare a vehiculilor contaminaţi, decontaminarea sau distrugerea lor (reducînd perioada în care vehiculii pot transmite virusul).

14.3.1.3. *Gazda*

A treia verigă a lanţului epidemiologic este organismul (uman sau animal) susceptibil, apt de a contracta boala (ca urmare a unor contacte suficient de strînse cu surse de infecţie, cu elemente contaminate dintr-o anumită zonă în care se află receptorul). Receptivitatea presupune intrarea, supravieţuirea şi replicarea virusului ; ea este opusul stării de rezistenţă, ce presupune inactivarea şi eliminarea rapidă a virusului.

Absenţa rezistenţei este determinată de lipsa imunităţii (locală, umorală sau mediat-celulară) faţă de agenţii virali ; aceasta poate fi la nivelul „porţii de intrare“, al lichidelor organismului, al spaţiilor intercelulare sau al celulelor-ţintă ; imunitatea poate fi dobîndită activ (prin boală naturală sau vaccinare), pasiv (prin transfer de anticorpi materni transmişi copilului mic ori prin administrări la adulţi de anticorpi prelevaţi de la alte organisme trecute prin boală) sau prin unii factori nespecifici, potențați de condiții mai bune de viață și de diferiți factori externi.

Rezistența organismului este influențată și de variabilitățile antigenice ale unor virusuri (tipice virusurilor gripale, în special celor de de tip A).

Imunitatea antivirală joacă un rol important în patogeneza și manifestările clinice ale bolii, organismul uman susceptibil răspunzînd la agresiunea virală prin infecții :

— asimptomatice, cu vindecare ;
— simptomatice, acute, cu vindecare ;
— asimptomatice, cu stare de purtător aparent sănătos ;
— simptomatice, acute, cu evoluții fulminante ;
— simptomatice, cu cronicizare etc.

Mai rar, intervin organisme animale susceptibile (de mamifere, păsări, pești, artropode etc.).

Potențialul epidemiologic al masei receptive depinde de :

— densitatea susceptibililor și ponderea lor în populație ;
— gradul de expunere ;
— riscul unor evoluții mai severe.

O proporție foarte mare de rezistență din populație asigură o rezistență de grup *(hard immunity)*, nepermițînd dezvoltarea unor epidemii în colectivitatea respectivă.

14.3.2. FACTORII FAVORIZANȚI

După cum am mai menționat, factorii favorizanți ai procesului epidemiologic modulează — direct sau indirect — intervențiile factorilor determinanți. Ei precizează forma concretă de manifestare a procesului epidemiologic : extensia, intensitatea, gravitatea lui.

Astfel pot fi influențate :

— contagiozitatea surselor de infecție (mobilitatea acestora, durata pînă la depistare și izolare) ;

— transmiterea virusului pe diverse căi (numărul, gradul și durata de contaminare a vehiculilor de transmitere, circulația acestora, șansele de depistare și de contaminare, frecvența contactelor interumane etc.) ;

— susceptibilitatea populației ;

— severitatea bolii și rezistențele specifică și nespecifică (eficiența reacțiilor imune).

1. În cazul factorilor ecologici din mediul natural, factorii fizici (temperatura, umiditatea, presiunea, curenții de aer — condițiile meteorologice în general) pot favoriza direct diseminarea bolii și scăderea rezistenței organismelor (de exemplu, în sezonul rece probabilitatea fixării și replicării virusurilor respiratorii la „poarta de intrare“ respectivă este mai mare, în sezonul cald aceeași afirmație putîndu-se face despre virusurile digestive).

Influențe similare, dar mai slabe, pot avea și condițiile geografice (latitudinea, altitudinea, relieful și clima asociate, solul, apa, aerul, cîmpurile electromagnetice și radiațiile terestre). Condițiile cosmice (activitatea solară, radiațiile ultraviolete și cosmice) au o acțiune virulicidă, decontaminantă asupra vehiculilor de transmitere ; ele au în paralel o acțiune tonifiantă (crescînd rezistența organismelor receptive). Flora și fauna pot fi și ele implicate în transmiterea bolii, într-o alimentație cu influențe asupra receptivității etc. Calamitățile (cutremurele, inundațiile etc.) favorizează invaziile cu vectori, contaminarea hidrică, ducînd la înrăutățirea condițiilor de viață și a activității antiepidemice, cu implicațiile inerente.

2. Trecem la factorii individuali, avînd în general o importanță cel puțin la fel de mare ca cei ecologici. Ne referim în primul rînd la cei biologici :

— sexul, vîrsta în momentul infecției influențează morbiditatea și expunerea organismului, deci și riscurile de evoluție a bolii ;

— potențialul biologic, capacitatea adaptativă condiționată de factori fenotipici și genotipici (maladii concomitente, antecedente patologice individuale sau eredocolaterale etc.) influențează rezistența la boală și eficiența reacției imune.

O altă grupă de factori o constituie diversele condiții de viață ; ne referim la factori habitudinali individuali, dar și la factori economico-sociali (dependenți de tipul societății și de nivelul de dezvoltare a colectivității ce ne interesează) : vom menționa în acest sens condițiile de muncă, familiale, de locuit ; acestea indică expunerile la noxe, intervențiile diverselor aglomerări umane — care pot fi constante (în mediul urban), sezoniere (legate, de exemplu, de începutul anului școlar) sau ocazionale (corespunzătoare unor spectacole etc.) ș.a. ; anumite profesii implică o expunere mai mare la agresiunea virală (de exemplu, un contact mai strîns cu copiii, cu bolnavii contagioși) sau o capacitate de difuziune mai mare (personalul de deservire din unități cu mulți receptivi, cu bunuri de uz curent) ; de asemenea, regimul insuficient de odihnă, fumatul, consumul de alcool sau abuzul de medicamente, regimul de alimentație necorespunzător (în acest caz ne referim și la modul de achiziționare, depozitare, distribuire, preparare, consum al alimentelor), o educație sanitară deficitară, anumite deprinderi nesănătoase etc. măresc expunerea la agenții patogeni (favorizînd diseminarea virusurilor pe căile respiratorie, digestivă, cutanată, sexuală etc.) și reduc potențialul biologic și eficiența reacțiilor imune de apărare ale organismelor umane. Factorii demografici, de vîrstă, sex etc. au o pondere importantă în receptivitatea populației.

14.4. DEPISTAREA ȘI IDENTIFICAREA FENOMENELOR MORBIDE DE MASĂ (SUPRAVEGHEREA EPIDEMIOLOGICĂ ÎN VIROZE)

În prezența unui risc apreciabil de apariție sau agravare (înmulțire) a unor fenomene morbide de masă este indispensabilă o supraveghere continuă și adecvată a stării de sănătate a populației în vederea unor intervenții antiepidemice operative adaptate situației epidemiologice identificate precoce.

14.4.1. LANŢUL INFORMAŢIONAL-DECIZIONAL IMPLICAT ÎN SUPRAVEGHEREA EPIDEMIOLOGICĂ

Supravegherea epidemiologică şi intervenţia antiepidemică presupun extragerea şi valorificarea informaţiilor necesare de către verigile unui lanţ informaţional-decizional (fig. 14-4).

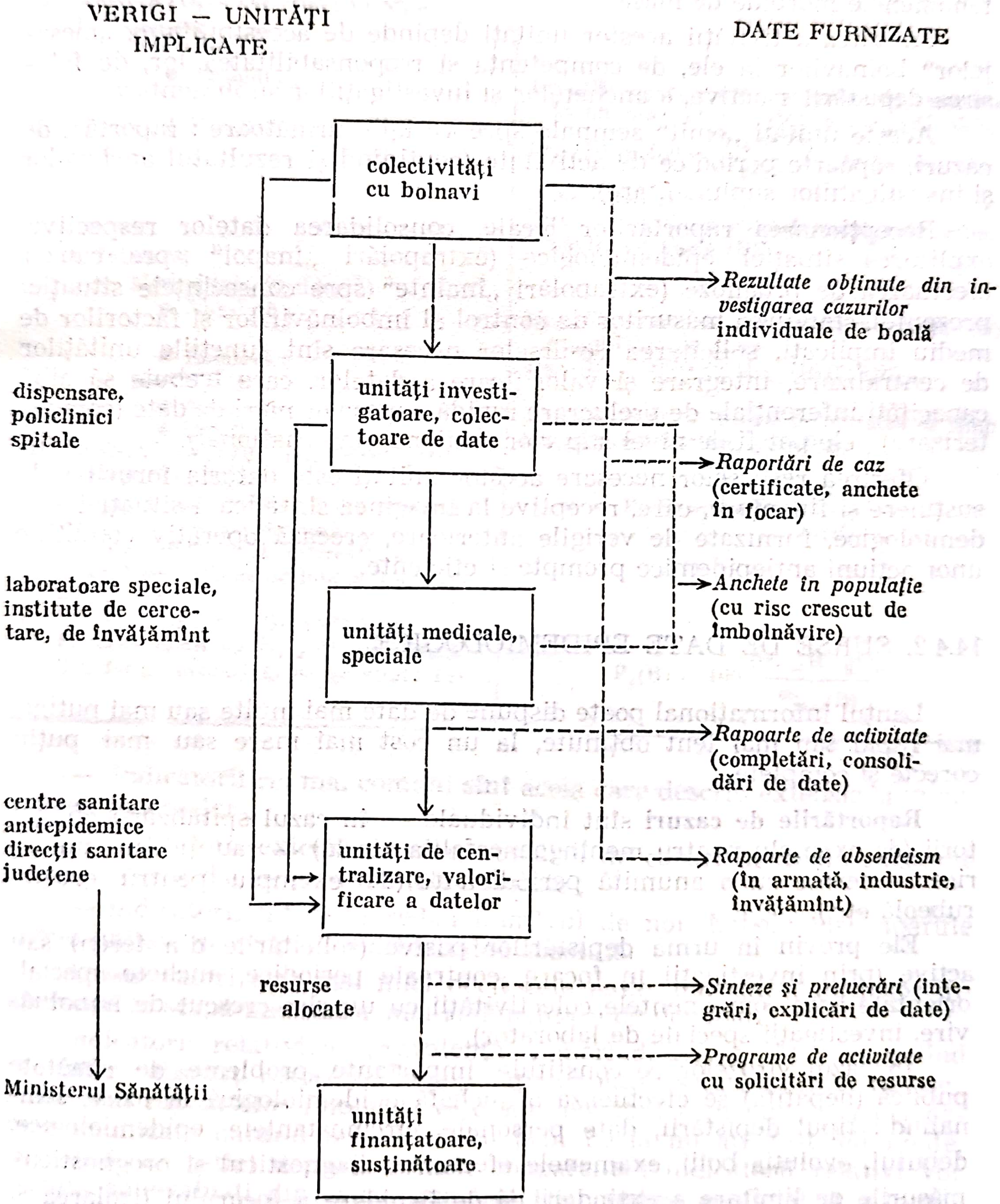

VERIGI – UNITĂŢI IMPLICATE
DATE FURNIZATE
colectivităţi cu bolnavi
Rezultate obţinute din investigarea cazurilor individuale de boală
dispensare, policlinici spitale
unităţi investigatoare, colectoare de date
Raportări de caz (certificate, anchete în focar)
laboratoare speciale, institute de cercetare, de învăţămînt
Anchete în populaţie (cu risc crescut de îmbolnăvire)
unităţi medicale, speciale
Rapoarte de activitate (completări, consolidări de date)
centre sanitare antiepidemice direcţii sanitare judeţene
unităţi de centralizare, valorificare a datelor
Rapoarte de absenteism (în armată, industrie, învăţămînt)
resurse alocate
Sinteze şi prelucrări (integrări, explicări de date)
Programe de activitate cu solicitări de resurse
Ministerul Sănătăţii
unităţi finanţatoare, susţinătoare

Fig. 14-4 — Lanţul informaţional în supravegherea epidemiologică.

La capătul acestui lanț bolnavul „emite“ spontan sau suscitat semnale clinice, paraclinice (serologice), epidemiologice referitoare la evoluția și condițiile de apariție a bolii (semnalele trebuie să fie observabile, elocvente, bogate, utile în combaterea bolii).

Recepția, decodarea semnalelor amintite (stabilirea diagnosticului și prognosticului) sînt realizate de unități investigatoare, colectoare de date (de obicei la nivel local — dispensarele —, care uneori colaborează cu unități de competență superioară) ; sînt astfel depistate și caracterizate fenomenele morbide de masă.

Calitatea activității acestor unități depinde de accesibilitatea „mesajelor“ bolnavilor la ele, de competența și responsabilitatea lor, de folosirea depistărilor active, a anchetelor și investigațiilor suplimentare.

Aceste unități „emit“ semnale spre verigile următoare : raportări de cazuri, rapoarte periodice de activitate (conținînd și rezultatul anchetelor și investigațiilor suplimentare).

Recepționarea raportărilor locale, consolidarea datelor respective, explicarea situației epidemiologice (extrapolări „înapoi“ spre cauze), efectuarea de prognoze (extrapolări „înainte“ spre consecințele situației prezente), stabilirea măsurilor de control al îmbolnăvirilor și factorilor de mediu implicați, solicitarea resurselor necesare sînt funcțiile unităților de centralizare, integrare și valorificare a datelor, care trebuie să aibă capacități inferențiale de prelucrare rapidă a maselor mari de date (computerizare) ; ele pot fi de nivel superior (național, internațional).

Oferirea resurselor necesare acestor unități este datoria forurilor de susținere și finanțare, care, receptive la imaginea sintetică a situației epidemiologice, furnizate de verigile anterioare, creează operativ condițiile unor acțiuni antiepidemice prompte și eficiente.

14.4.2. SURSE DE DATE EPIDEMIOLOGICE

Lanțul informațional poate dispune de date mai multe sau mai puține, mai rapid sau mai lent obținute, la un cost mai mare sau mai puțin corecte și complete.

Raportările de cazuri sînt individuale — în cazul spitalizării obligatorii (de exemplu pentru meningoencefalita virală) — sau globale, numerice — cerute cu o anumită periodicitate (de exemplu pentru oreion, rubeolă etc.).

Ele provin în urma depistărilor pasive (solicitările din teren) sau active (prin investigații în focare, controale periodice, anchete speciale orientate spre componentele colectivității cu un risc crescut de îmbolnăvire, investigații speciale de laborator).

În cazul virozelor ce constituie importante probleme de sănătate publică (hepatita) se efectuează o anchetă epidemiologică în focar, semnalînd : tipul depistării, date personale, circumstanțele epidemiologice, debutul, evoluția bolii, examenele efectuate, diagnosticul și prognosticul, măsurile de limitare a extinderii și de lichidare a focarului (izolarea și tratarea bolnavului, urmărirea contacților, dispensarizarea convalescenților, dezinfecții în focar, eventual administrări de imunoglobuline, educație sanitară etc.).

Sinteza raportărilor este realizată prin evaluarea diverșilor indicatori epidiomiologici uzuali (tabelul 14-1) :

TABELUL 14-1

Indicatori utili în epidemiologia descriptivă

A. INDICATORI DE FRECVENȚĂ :	
1. Extensivi	
— Prevalență	
● Absolută :	$Pr_{abs}(B)$ = nr. cazuri de boală (B) existente la un moment dat (într-o perioadă dată)
● Relativă :	$Pr_{rel}(B) = 100 \frac{Pr_{abs}(B)\%}{P(B)}$ (rate ale prevalenței) [$P(B)$ = populația expusă riscului de îmbolnăvire cu boala (B)]
2. Intensivi	
— Morbiditate (incidență)	
● Absolută :	$Mo_{abs}(B)$ = nr. de noi cazuri de boală (B) pe unitatea de timp
● Relativă :	$Mo_{rel}(B) = 100\,000 \cdot Mo_{abs}(B)/P(B)\,^0/_{0000}$
— Mortalitate	
● Absolută :	$Mt_{abs}(B)$ = nr. de decese pe unitatea de timp
● Relativă :	$Mt_{rel}(B) = 1\,000 \cdot Mt_{abs}(B)/P(B)$
B. INDICATORI DE DISTRIBUȚIE (REPARTIȚIE) :	
Ponderea componentei F din populație cu Pr(B,F) cazuri de boală (B) [componentele sînt diferențiate după intensitatea (F) de acțiune a unor factori de risc]	$P_F(B) = 100 \frac{Pr_{abs}(B, F)\%}{Pr(B)}$
C. INDICATORI DE GRAVITATE :	
Ponderea cazurilor Pr_{abs} (B, g) de boală (B), forma evolutivă, de gravitate (g)	$P_g(B) = 100 \frac{Pr_{abs}(B, g)\%}{Pr_{abs}(B)}$

— indicatorii cei mai comuni sînt aceia care descriu extensia și intensitatea proceselor ;

— indicatorii extensivi redau numărul de cazuri de boală existente la un moment dat — prevalențele absolute ;

— indicatorii intensivi redau numărul de noi îmbolnăviri apărute într-o unitate de timp — morbiditatea absolută.

Aceste valori sînt mai mici decît cele reale, din cauza formelor inaparente ce scapă metodelor mai rudimentare de depistare.

Indicatorii relativi de prevalență și morbiditate se obțin raportînd indicatorii absoluți respectivi la populația expusă riscului de îmbolnăvire ; numitorul rapoartelor implicate este supraevaluat prin faptul că persoanele imunizate natural prin trecerea prin boală nu au fost eliminate, neputîndu-se astfel depista formele inaparente ; indicatorii relativi vor rezulta subevaluați din cauza numărătorilor reduși artificial și a numitorilor crescuți din motivele amintite.

Indicatorii de distribuţie (repartiţie) a îmbolnăvirilor pe diverse categorii de indivizi completează pe cei anteriori amintiţi. Categoriile se referă la componente ale colectivităţii, diferind printr-o caracteristică biologică sau prin intensitatea unor factori de risc sau protectori ; indicatorii de distribuţie exprimă proporţia de îmbolnăviri ce afectează indivizi făcînd parte dintr-un anumit grup (ne referim, de exemplu, la îmbolnăvirile defalcate pe grupe de vîrstă).

Uneori categoriile se referă la diversele modalităţi evolutive ale bolii, şi atunci indicatorii de distribuţie dau ponderea proporţiilor de evoluţii mai mult sau mai puţin severe, de cazuri fruste sau medii, cu complicaţii, cronicizări, invalidităţi, deces.

Anchetele epidemiologice sînt investigaţii active (independente de semnalarea de cazuri concrete) şi sînt efectuate de către echipe specializate ale unităţilor de nivel superior în populaţii cu risc crescut de îmbolnăvire (se urmăreşte, de exemplu, distribuţia unor markeri de boală în corelaţie cu cea a factorilor determinanţi sau favorizanţi — de risc sau protectori).

Anchetele retrospective urmăresc consecinţele actuale ale unor îmbolnăviri din trecut sau analizează procese epidemiologice consumate. Ele utilizează în mod rapid numeroase date ieftine, insuficiente cantitativ şi calitativ (din arhive), referitoare la starea de sănătate a unor grupe de indivizi, considerate simultan (anchete transversale).

Neputînd evalua populaţiile receptive din trecut nu se pot calcula indicatorii de risc absolut (prevalenţele şi morbidităţile relative anterior menţionate) ; indicatorii de risc relativ pot fi totuşi obţinuţi raportînd numărul de îmbolnăviri în prezenţa unui factor la numărul de îmbolnăviri în absenţa acelui factor.

Cercetările respective pot adăuga ipoteze noi celor sugerate de epidemiologia descriptivă.

Anchetele prospective urmăresc în viitor procese în curs de desfăşurare, folosind date obţinute cu metode actuale ; ele presupun investigaţii complexe şi repetate ale unei mase mari din populaţie şi oferă — mai tîrziu şi mai costisitor — date de o calitatea deosebită. Aceste anchete sînt adeseori longitudinale ; se referă la sănătatea aceloraşi cohorte de indivizi, cercetate repetat.

Fiind cunoscute populaţiile influenţate de diverşi factori de risc, numerele de susceptibili şi de îmbolnăviri, se pot estima indicatorii de risc absoluţi menţionaţi.

Se pot obţine corelaţii statistic semnificative validînd ipoteze referitoare la implicaţia diverşilor factori în propagarea virozelor (orientînd acţiunile antiepidemice spre componentele colectivităţii cu un risc realmente crescut de îmbolnăvire).

Acestor anchete li se alătură *experimentele* virusologice, în care se observă efectele diferitelor expuneri verificate pe loturi de voluntari ; acestea sînt cele mai concludente, cer însă respectarea normelor medicale, etice, juridice etc.

Rapoartele de activitate ale unor unităţi medicale coordonatoare sau foruri metodologice, institute de cercetare şi învăţămînt pot efectua diverse sinteze, completări sau consolidări de date (de exemplu, adăugînd informații despre semnele complexe de boală, despre boli în antecedente sau concomitente etc.).

Rapoarte ale unor unități economico-sociale afectate de epidemiile virale (din armată, industrie, învățămînt) relatează absenteismul asociat.

14.5. PREVENIREA ȘI COMBATEREA VIROZELOR

Măsurile de prevenire și combatere a virozelor urmăresc întreruperea sau măcar slăbirea lanțului epidemiologic (a uneia dintre verigile sale). Ele sînt stabilite în funcție de factorii și mecanismele implicate și valorifică resursele rețelei antiepidemice și ale populației.

14.5.1. MĂSURI DE CONTROL AL SURSELOR DE INFECȚIE

Depistarea surselor de infecție este obiectivul unei supravegheri active și diferențiate a populației prin investigații periodice (mai puțin eficiente în cazul virozelor, decît în cazul bacteriozelor). Examenele folosite sînt clinice și paraclinice (analiza exsudatelor nazofaringiene, a probelor coprologice etc.) ; ele urmăresc descoperirea precoce a bolnavilor cu manifestări clinice sau a purtătorilor aparent sănătoși de virus.

Sursele de infecție deja depistate indică grupe de persoane cu risc crescut de a contracta boala (viitoarele surse de infecție) :

— contacții din focare (de exemplu din colectivități de copii și tineret cu oreion, rubeolă etc.) ;

— convalescenții (trebuie verificați dacă după aparenta lor vindecare nu au rămas purtători de virus, de exemplu în cadrul acțiunilor de dispensarizare a hepatitei).

— O altă categorie de persoane care face obiectul unei supravegheri minuțioase este reprezentată de cei care vin în contact cu mase mari de receptivi (direct sau prin obiecte de uz curent) și care, în cazul că ar fi surse de infecție, ar implica un mare risc de diseminare a bolii. Ne referim la personalul de deservire din colectivitățile de copii și tineret, din rețelele comerciale de distribuire a alimentelor și a celor comunale de distribuire a apei potabile, a aerului condiționat etc. (la încadrare și ulterior periodic aceștia sînt investigați conform legislației în vigoare). Înșiși membri colectivităților de copii la intrarea în colectivitate trebuie să prezinte un aviz epidemiologic ; ulterior, periodic, are loc un triaj epidemiologic pentru a împiedica intrarea sau rămînerea în colectivitate a unei surse de infecție.

Purtătorii aparent sănătoși de virus trebuie să constituie obiectul unor largi campanii de depistare, țintind în special spre grupele de persoane care în trecut au avut un risc mai mare de contaminare (din vechi focare și din sectoarele de activitate menționate).

Sursele de infecţie depistate sînt împiedicate să disemineze virusul prin **măsuri specifice** — de exemplu, prin instituiri de baraje :

— *la ieşire :* se izolează sursele de infecţie descoperite prin spitalizare (în cazurile mai severe, de exemplu în cazul hepatitelor virale) sau la domiciliu (în cazurile de rubeolă, oreion) ;

— *la intrare :* măsuri de tipul celor enunţate, îndepărtînd apoi din sectoarele de muncă sursele de infecţie depistate (de exemplu, purtătorii de virus aparent sănătoşi în cazul hepatitelor virale) pînă la sterilizarea lor.

Izolarea este continuată în mod natural de măsurile de neutralizare a sursei de infecţie şi sterilizare de agenţii patogeni virali ai organismului respectiv, prin tratamente ambulatorii sau spitalizare.

La Centrul Sanitar Antiepidemic sau în cadrul acţiunilor de dispensarizare se ţine o evidenţă a purtătorilor de virus, urmărindu-se tratarea lor corespunzătoare (ne referim în special la hepatita virală de tip B). Măsurile anterior discutate reduc frecvenţa contactelor directe interumane (surse de infecţie — susceptibili).

14.5.2. BLOCAREA CĂILOR DE TRANSMITERE

Ne-am referit mai sus la transmiterea directă a infecţiei, la prevenirea şi combaterea ei. În cazul transmiterii indirecte se urmăreşte reducerea numărului de vehiculi de transmitere contaminabili, a gradului lor de contaminare, a capacităţii lor de a disemina virusul.

Măsurile preventive curente impun respectarea unor reguli igienico-sanitare generale — încă înaintea depistării unor surse de infecţie ; ele vizează :

— împiedicarea contaminării mediilor (apă, aer, sol etc.) prin salubrizări, dezinfecţii ale spaţiilor de viaţă, de muncă şi de utilitate publică, prin controlul calităţii apei, aerului, alimentelor (respectarea regulilor de funcţionare a reţelelor comerciale, comunale etc.) ;

— împiedicarea contaminării şi acţiunii contaminante a obiectelor de uz curent prin îmbunătăţirea igienei individuale şi colective, prin educaţie sanitară (mai ales a copiilor şi tinerilor) ;

— instrumentele şi instalaţiile medicale impun măsuri de sterilizare a lor înaintea fiecărei întrebuinţări, prin utilizarea de agenţi fizici — termici (aer cald uscat în etuve şi pupinele, abur sub presiune în autoclave, fierbere pentru obiectele din cutii metalice), radiaţii ultraviolete, gamma — sau chimici — formol, trioximetilen etc.

Alte măsuri vizează împiedicarea intervenţiei vectorilor în procesul epidemiologic, prin dezinsecţie sau deratizare, urmărind împiedicarea înmulţirii şi intrării lor în spaţiile de viaţă şi de muncă, îndepărtarea şi distrugerea lor ; cel mai des sînt utilizaţi factorii chimici ; insecticidele pot fi :

— cu acţiune rapidă, dar reversibilă, pe căile de acces respiratorie sau digestivă (de exemplu piretrinele sau unele substanţe organofosforice) ; insectele sînt temporar paralizate, ceea ce permite îndepărtarea şi eventual incinerarea lor ;

— cu efecte mai lente, dar ireversibile (substanțe organoclorurate, carbamați sau alte substanțe organofosforice).

Dintre raticide, menționăm pe cele cu întrebuințare unică sau repetată, plasate pe momeli alimentare și care, prin efectele lor anticoagulante, produc hemoragii fatale. Mai rar sînt folosiți factori fizici : îndepărtarea mecanică (perieri, capcane), tratamente termice (flambări, călcări cu fierul încins, fierberi, incinerări, aer sau abur cald, frig etc.).

Măsuri instituite în focar. După apariția surselor de infecție riscul de contaminare este crescut ; în focar se cer instituite cît mai precoce și energic măsuri de dezinfecție, vizînd neutralizarea agenților patogeni : preliminar, mecanic (prin aerisire, periere, spălare) sau chimic, se îndepărtează majoritatea materiilor organice eventual contaminate ; ulterior intervin dezinfectanții fizici — termici, radiații ultraviolete — sau chimici.

În funcție de natura, modul de acțiune și concentrațiile dezinfectanților, de obiectul dezinfecției se aleg materialele respective, aplicate prin spălare, stropire, vaporizare, aerosolizare etc.

Unele produse sînt mai corozive și mai instabile (varul cloros, cloramina care acționează prin clor degajat, decontaminînd în special diverse suprafețe).

Formolul și soda de rufe servesc la dezinfectarea rufelor, ca și derivații fenolici (anionici — Dero, perlan —, cationici — bromocet — sau amfolitici — Tego).

Alți dezinfectanți mai puțin folosiți (permanganatul de potasiu, apa oxigenată, derivații de iod mai puțin corozivi) sînt destinați dezinfectării tegumentelor, mucoaselor (cu sau fără leziuni), a unor obiecte de cauciuc sau din plastic etc.

14.5.3. PROTECȚIA MASEI RECEPTIVE

O primă categorie de măsuri preventive — mai puțin eficace — a fost deja menționată mai sus ; ne referim la limitarea expunerii masei receptive prin : baraje la intrările în colectivitățile cu mulți receptivi, educație sanitară (recomandînd evitarea în perioada epidemică a aglomerațiilor, de către persoanele netrecute prin boală).

Imunoprofilaxia. Cele mai eficiente măsuri de control al virozelor sînt cele de creștere a rezistenței specifice, prin crearea unei protecții similare cu cea indusă de infecția naturală, dar fără boală clinică însoțitoare sau disconfort ; ne referim la imunoprofilaxia activă care asigură imunizarea prin vaccinare (vezi capitolul 11).

Producerea și utilizarea unor vaccinuri eficiente a dus la o importantă scădere a morbidității prin unele viroze (uneori chiar la eradicarea acestor boli — de exemplu, poliomielita, variola).

Vaccinurile pot combate una sau mai multe viroze, fiind deci mono- sau plurivalente (după cum imunizarea se obține în raport cu una sau mai multe tulpini ale aceluiași virus, vaccinurile pot fi simple sau complexe).

Tehnica de preparare trebuie să respecte strict anumite reguli, care să asigure obţinerea unui produs conform standardelor, lipsit de riscurile posibile.

Vaccinurile vii folosesc virusuri înrudite antigenic, dar nevirulente pentru gazda respectivă sau tulpini atenuate cu virulenţă scăzută.

Vaccinurile inactivate sînt obţinute din suspensii de virus cu titruri înalte, inactivate prin agenţi fizici (căldura, radiaţiile, ultrasunetele) sau chimici (fenol, formol etc.) ce afectează virulenţa, menţinînd determinanţi antigenici. În ultimul timp se utilizează frecvent fracţiuni virale (de exemplu, hemaglutinina în vaccinul gripal, în cel rujeolic).

Unele vaccinuri au reuşit să concureze cu succes vaccinurile vii : de exemplu NIVGRIP realizat la Institutul de Virusologie, administrabil intranazal sau oral, conferă o imunitate corespunzătoare.

Vaccinurile sintetice au beneficiat de pe urma identificării şi selectării determinanţilor antigenici şi a fragmentelor genomice, ce le codifică (folosind anticorpi monoclonali, hibridări, secvenţierea oligonucleotidică) ; s-au realizat produse cu o structură antigenică mult simplificată, ceea ce a condus la o imunogenitate limitată.

Administrarea vaccinurilor virale se face după standardizarea şi omologarea lor conform normelor în vigoare, cu produse conservate adecvat şi administrate conform cu metodologia şi calendarul aprobat, ţinînd seama de indicaţiile şi contraindicaţiile respective.

Eficienţa epidemiologică a vaccinării se evaluează în stadii comparative ale morbidităţii — pe loturi vaccinate în raport cu loturi-martor nevaccinate — cu ponderi similare ale maselor receptive.

Un vaccin corespunzător trebuie să reducă de cîteva ori morbiditatea la lotul vaccinat faţă de lotul-martor.

Imunoprofilaxia pasivă introduce în organism preparate cu titru ridicat de anticorpi, cu acţiune imediată, aplicate cît mai aproape de momentul expunerii (acţiunea lor nefiind persistentă — 10—15 zile).

Imunoglobulinele specifice se utilizează foarte precoce în cazul virusului rabic, al HVA şi HVB pentru a împiedica diseminarea virusului penetrant, alteori pentru a atenua severitatea formei de boală (în rujeolă, oreion).

Mai rar se administrează imunoglobulinele nespecifice — gammaglobuline — la contacţi, dar creşte numărul de forme inaparente (în cazul hepatitelor).

Mai rar (din cauza riscului de reacţie imediată — şoc anafilactic — sau tardivă — boala serului la persoane hipersensibile) se aplică seruri cu titru crescut de anticorpi specifici.

Administrarea are caracter de mare urgenţă şi se face după anamneză sau testare pentru a exclude riscul reacţiilor menţionate (altfel se cere un tratament preliminar de desensibilizare).

Profilaxia medicamentoasă. Drogurile cu acţiune profilactică prezintă o importanţă deosebită în cazul infecţiilor cu virusuri care produc epidemii şi pandemii, ca, de exemplu, virusul gripal, unele paramyxovirusuri, poxvirusuri etc.

Rezultatele cele mai spectaculare s-au obţinut în infecţiile gripale, cu medicamente ca ribavirina, amantadina, rimantadina, existente de mai mulţi ani în reţelele sanitare ale S.U.A., U.R.S.S. şi în multe alte ţări.

În Institutul de Virusologie s-au testat pentru acțiunea profilactică antigripală mai multe extracte de plante (usturoi, hrean, sfeclă roșie, ridiche neagră), Chamenerion, ca și derivate lactate (iaurt fiert, supernatant de iaurt fiert) și extracte de produse apicole (propolis), care au dat bune rezultate *in vitro* și pe animale, mai ales în scheme de imunomodulare.

Interferonul exogen leucocitar a fost administrat pe loturi limitate (mai mult experimental) cu rezultate bune în prevenirea unor infecții virale, singur sau în asociere cu alte preparate profilactice sau droguri terapeutice (vezi capitolul 12).

14.6. MODELE MATEMATICE ÎN EPIDEMIOLOGIA VIRALĂ

14.6.1. VARIABILE ȘI RISCURI EPIDEMIOLOGICE

După cum s-a arătat anterior conceptele epidemiologice esențiale sînt legate de transferul agenților patogeni virali; menționăm organismele (surse de infecție sau susceptibile) și căile (vehiculi) de transmitere. În cursul propagării virozelor, „suporturile“ trec printr-o serie de stări caracteristice.

Numerele „ocupanților“ acestor stări (de organisme sau vehiculi) reprezintă variabilele ce descriu situația epidemiologică; probabilitățile tranzițiilor între stările menționate constituie parametrii dinamici, condiționînd evoluția fenomenelor morbide de masă induse de virusuri.

De exemplu, organismele umane pot trece prin stările de:

— susceptibili necontaminați (numărul lor va fi notat cu N_S);

— susceptibili contaminați (infectați fără manifestări clinice de boală) (notați cu N_{BO});

— bolnavi contagioși (asimptomatici sau cu manifestări clinice) (notați cu N_{BA} sau N_{BM});

— vindecați și imunizați;

— bolnavi cronici (într-o alternativă evolutivă mai rar întîlnită) (notați cu N_{BC});

— purtători aparent sănătoși de virus (într-o altă alternativă) (notați cu N_{BP});

— decedați ca urmare a unei evoluții nefavorabile a bolii acute sau cronice.

Similar, vehiculii de transmitere pot fi:

— necontaminați (notați cu N_{VN});

— contaminați (notați cu N_{VC});

— alterați (cînd sînt inerți) sau „bolnavi“ (cînd sînt vectori);

— distruși ș.a.m.d.

În funcție de stările organismelor umane afectabile de viroze și de tranzițiile dintre ele, putem discerne o serie de *riscuri epidemiologice*:

a) Creșterea masei receptive, de obicei legată de natalitatea — N — și de proporția de susceptibili — η — dintre nou-născuți (fără rezistență naturală).

b) Riscul de menţinere a stării de susceptibilitate — MTS —, proporţional cu vîrsta medie de îmbolnăvire — V_m — (redusă de intensificarea procesului epidemiologic).

c) Riscul unui contact (direct sau mediat de un vehicul de transmitere) al susceptibilului cu o sursă de infecţie — CTS ; acesta creşte cu numărul de vehiculi contaminabili.

d) Riscul unei recepţionări efective de virus — ACV — de către susceptibil cu ocazia contactului menţionat.

Riscurile anterioare se pot grupa în :

— risc de expunere efectivă la contaminare :

$$\mathrm{EXPS} = \mathrm{CTS} \cdot \mathrm{ACV}$$

— risc global de angrenare a unui susceptibil în procesul epidemiologic :

$$\mathrm{ITR} = \mathrm{EXPS} \cdot \mathrm{MTS}$$

acesta mai poate fi notat simplificat cu λ.

e) După contaminare, putem defini riscul unei anumite modalităţi evolutive a bolii din seria menţionată de posibilităţi — RBO, RBA, RBM, RBC sau RBP. Cu ajutorul acestor riscuri putem calcula :

— proporţia de forme aparente :

$$f_{ap} = \frac{\mathrm{RBM} + \mathrm{RBC}}{\mathrm{RBA} + \mathrm{RBM} + \mathrm{RBC}}$$

— proporţia de purtători cronici :

$$f_{pc} = \frac{\mathrm{RBP}}{\mathrm{RBM} + \mathrm{RBC}}$$

— numărul total de bolnavi contagioşi şi de purtători aparent sănătoşi :

$$N_{BA} + N_{BM} + N_{BC} = \frac{N_{BM} + N_{BC}}{f_{ap}} \text{ şi}$$

$$N_{BP} = (N_{BM} + N_{BC}) \cdot f_{pc}$$

f) Alte riscuri de luat în considerare sînt cele de menţinere a contagiozităţii pentru diversele modalităţi evolutive enumerate — MCO, MCA, MCM, MCC şi MCP —, toate proporţionale cu duratele de contagiozitate respectivă (grupabile în durate ale unor evoluţii acute — τ_A — sau cronice — τ_C). Ele depind de izolarea bolnavilor, de eficienţa tratamentelor sterilizante etc.

g) Pentru bolnavii sau purtătorii contagioşi există riscuri de contactare directă sau mediată a susceptibililor — CTR_i ; şi acestea cresc odată cu numărul de vehiculi contaminabili, cu mobilitatea surselor de infecţie ; riscurile se diferenţiază în funcţie de modalitatea evolutivă a sursei de infecţie ($i = $ O, A, M, R, P).

h) Cu ocazia contactelor menţionate intervine riscul transferului difuzării efective de virus de pe sursa de infecţie — DV_i ($i = $ O, A, M, C, P).

Și în aceste cazuri se pot defini riscuri grupate :

— de diseminare efectivă a virusului de pe sursa de infecție :

$DIF_i = CTR_i \cdot DV_i$;

— de intervenție efectivă a sursei de infecție în procesul epidemiologic — ITS — ținînd seama și de riscurile de menținere a stării de contagiozitate — MC_i— :

$ITS = \sum_i MC_i \cdot DIF_i$

i) Prin imunizări naturale (trecere prin boală) sau artificiale (vaccinare) organismele ies din procesul epidemiologic.

Pot exista însă și unele situații nefavorabile care de asemenea determină ieșirea organismelor din procesul epidemiologic și cărora li se asociază riscuri corespunzătoare :

— riscul de vindecare (cu sechele, invalidități) — VS_i ;

— riscul de evoluție letală prin complicații grave — EVL.

Ca o sinteză a riscurilor epidemiologice de mai sus se poate defini riscul de transmitere efectivă a virusului de la sursa de infecție pînă la îmbolnăvirea efectivă a susceptibilului contaminat :

$K = \sum_i MC_i \cdot DV_i \cdot CTR_i \cdot ACV \cdot MTS$ (i = O, A, M, C, P).

Acesta este un parametru de transmisibilitate, redînd intensitatea propagării virozei (produs al riscurilor asociate diverselor etape ale circulației agentului patogen viral).

Similar, am putea defini riscul de contaminare, alterare sau distrugere a vehiculilor, de transmitere (sau probabilitățile de decontaminare în prezența diverșilor factori decontaminanți) ; aceștia determină numărul de vehiculi contaminați, intervenind în riscurile de contactare anterior discutate.

Toate variabilele și riscurile menționate specifică proporții de persoane cu anumite caracteristici sau implicate în anumite procese parțiale legate de propagarea virusului (în funcție și de intervenția unor factori defavorizanți). Putem de asemenea defini grupe de persoane la care riscurile epidemiologice enumerate mai sus au valori mai mari și care trebuie să fie țintele prioritare ale acțiunilor antiepidemice.

14.6.2. MODELUL MATEMATIC SIMPLIFICAT FOLOSIT ȘI REGULARITĂȚILE EXPLICATE

Modelele matematice oferă posibilitatea evaluării variației proporțiilor de susceptibili și de bolnavi contagioși cu ajutorul unor ecuații de evoluție, stabilite în funcție de intensitățile proceselor și care modifică valorile variabilelor respective ; termenii respectivi ai ecuațiilor depind de parametrii (riscurile) epidemiologici. Rezolvarea acestor ecuații de evoluție permite obținerea corelațiilor explicative ale fenomenelor morbide de masă, și anume dintre caracteristicile lor globale, pe de o parte, și dintre parametrii epidemiologici și valorile inițiale ale varia-

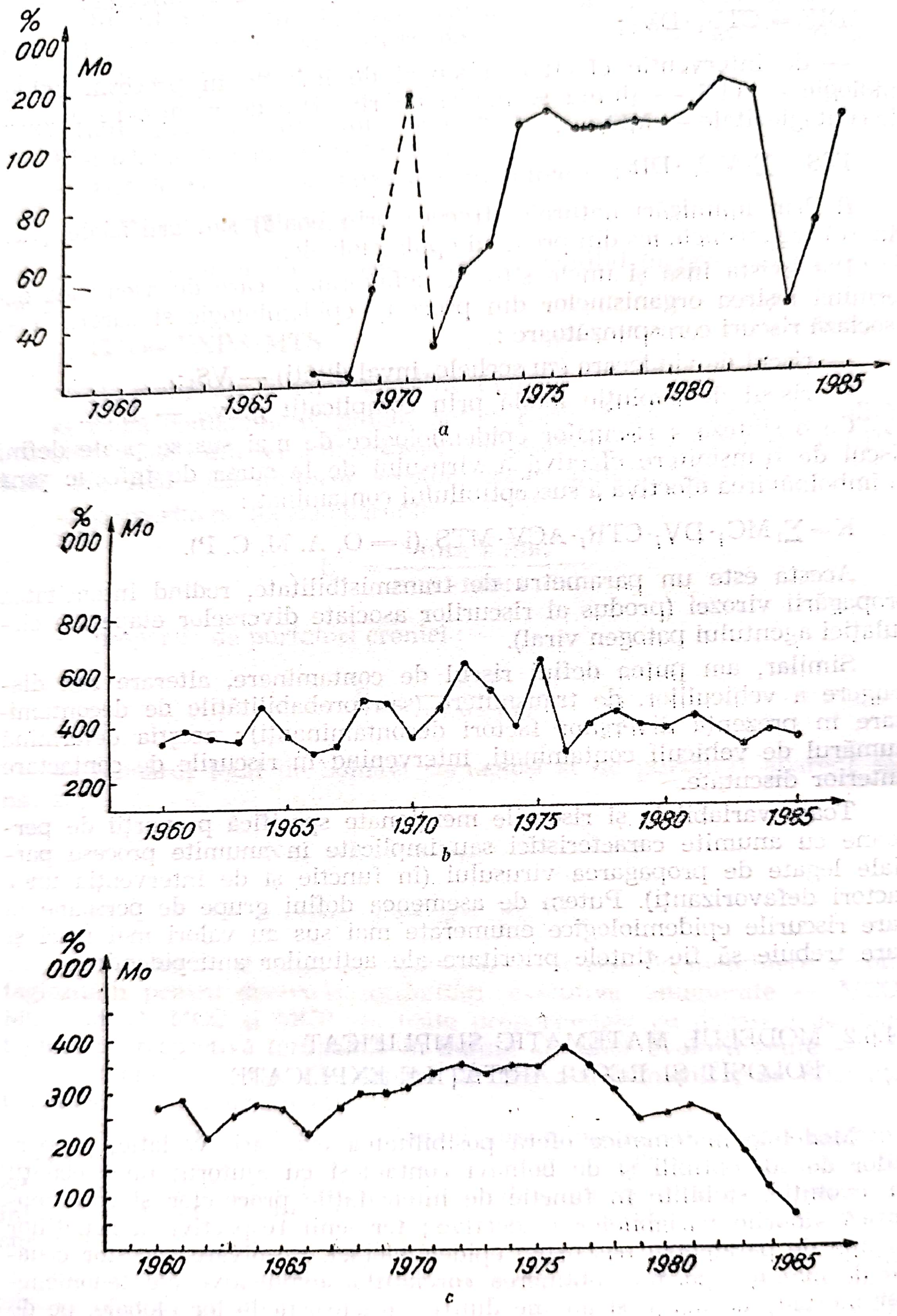
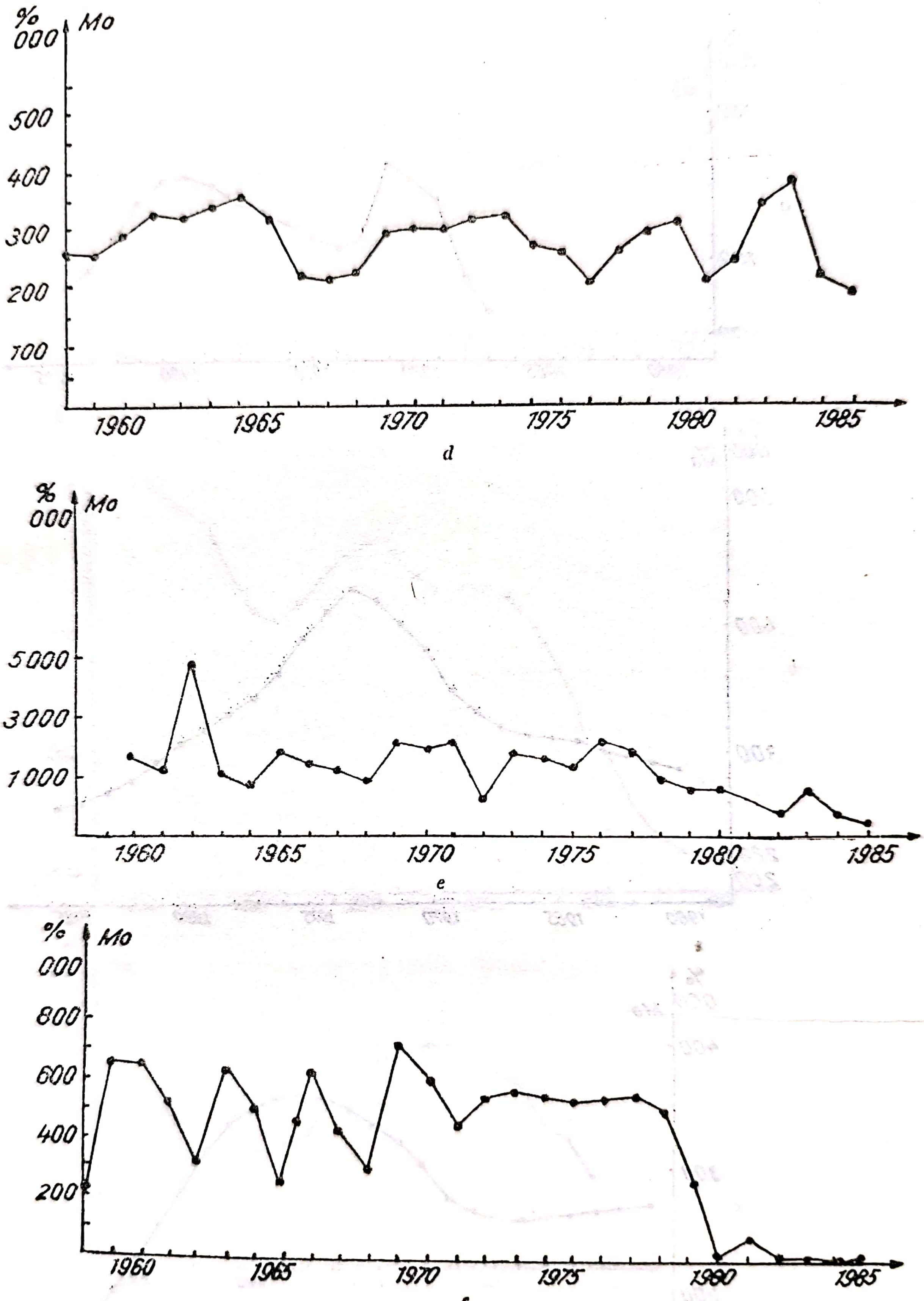


Fig. 14-5 — **Evoluţia morbidităţii în România :**
A — **rubeolă ;** *B* — **parotidită epidemică ;** *C* — **varicelă ;**



d

e

f

între anii 1967—1986, în unele boli virale.
D — hepatită virală ; *E* — gripă ; *F* — rujeolă.

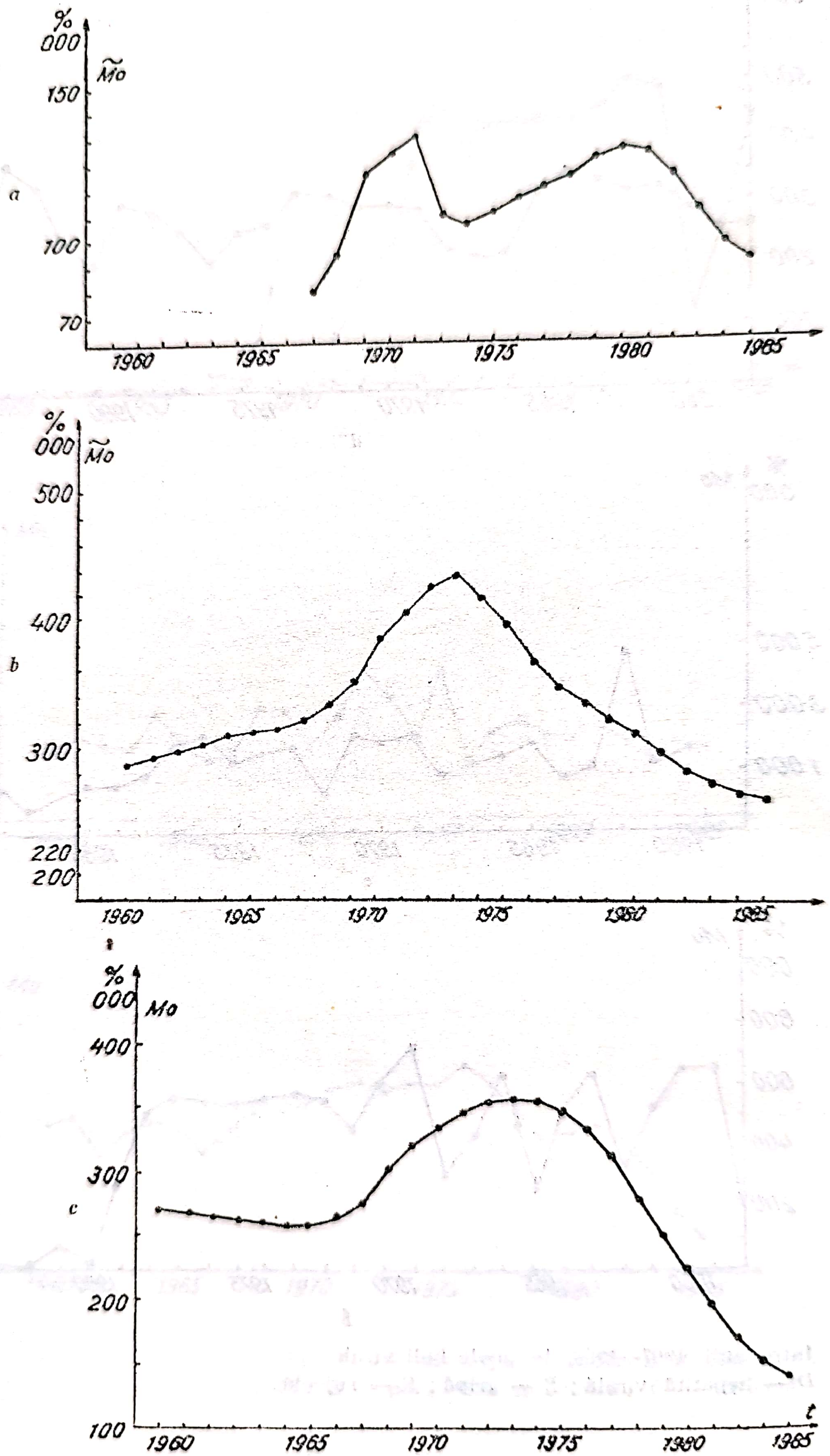
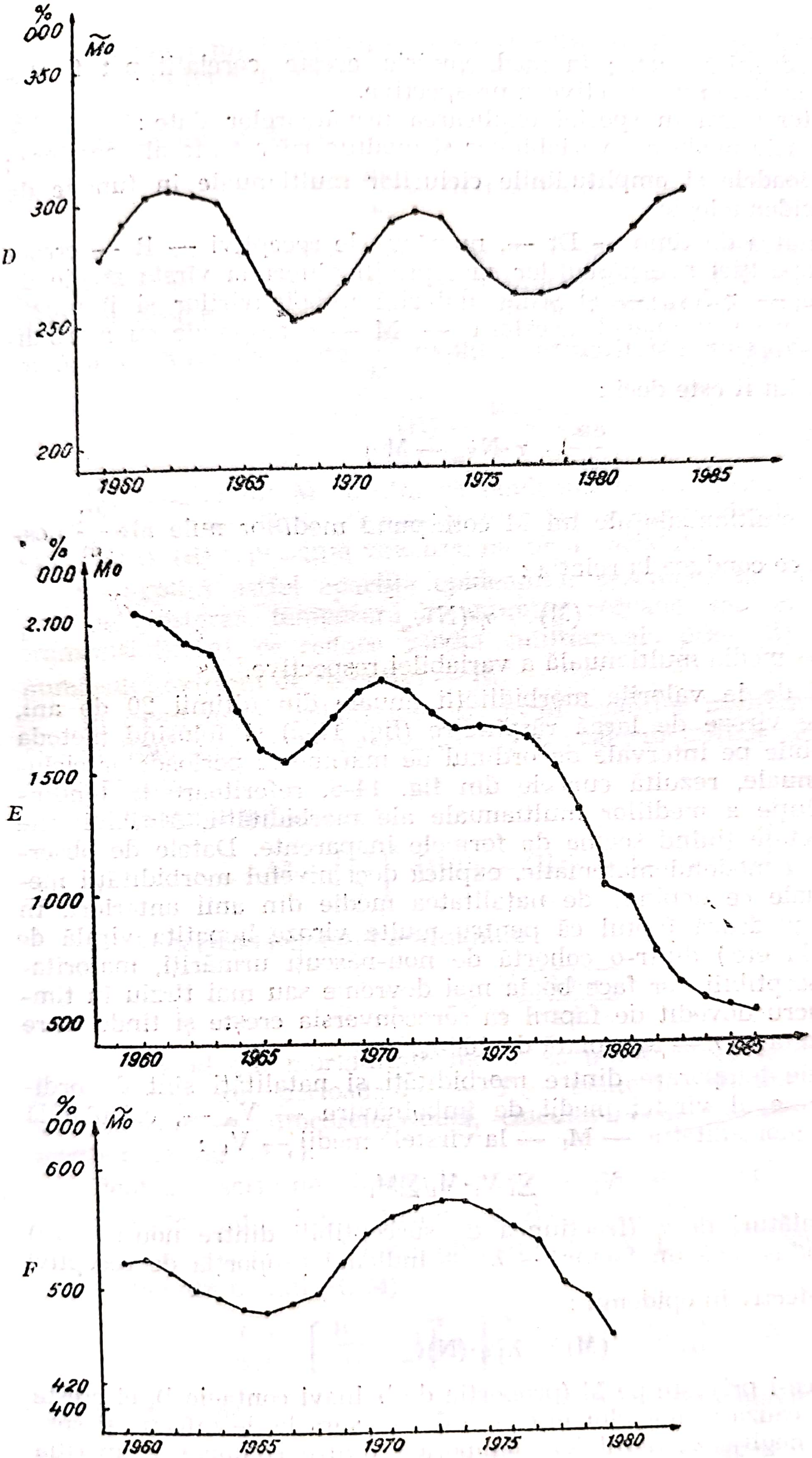


Fig. 14-6 — Curbele tendinţelor medii de evoluţie a morbidităţilor în *A* — rubeolă ; *B* — parotidită epidemică ; *C* — varicelă ;



România, între anii 1967—1986, în unele boli virale.
D — hepatită virală ; **E** — gripă ; **F** — rujeolă.

bilelor, pe de altă parte; în mod empiric, aceste corelații pot fi stabilite prin anchete retrospective și prospective.

Ne interesează în special explicarea următoarelor date:

— valorile medii ale variabilelor și modificărilor lente ale acestora;

— perioadele și amplitudinile ciclurilor multianuale în funcție de riscurile epidemiologice.

Pe unitatea de timp — Dt —, numărul de receptivi — R — crește din cauza apariției nou-născuților susceptibili ajunși la vîrsta medie de îmbolnăvire — $\eta \cdot N_{V_m}$ — și scade datorită îmbolnăvirilor și imunizărilor consecutive (numărul acestora — M — corespunde cu morbiditățile respective).

Ecuația lui R este deci:

$$\frac{dR}{dt} = \eta \cdot N_{V_m} - M$$

Mediile multianuale ale lui M corespund mediilor nule ale $\frac{dR}{dt}$ oscilante, ceea ce conduce la relația:

$$(M) = \eta \cdot (N)_{V_m}$$

în care (M) = media multianuală a variabilei respective.

Pornind de la valorile morbidității anuale din ultimii 20 de ani, pentru unele viroze de largă răspîndire (fig. 14-5) și folosind metoda mediilor mobile pe intervale de ordinul de mărime al perioadelor ciclurilor multianuale, rezultă curbele din fig. 14-6, referitoare la tendințele de evoluție a mediilor multianuale ale morbidității. Morbiditățile au fost corectate ținînd seama de formele inaparente. Datele de observație indică și modelul matematic, explică deci nivelul morbidității medii multianuale ce depinde de natalitatea medie din anii anteriori. În același sens pledează faptul că pentru multe viroze hepatita virală de tip A, rujeola etc.) dintr-o cohortă de nou-născuți urmăriți, majoritatea celor susceptibili vor face boala mai devreme sau mai tîrziu în timpul vieții, lucru dovedit de faptul că seroconversia crește și tinde către o valoare-limită — η — apropiată de 100%.

Decalajele temporare dintre morbidități și natalități sînt de ordinul de mărime al vîrstei medii de îmbolnăvire — V_m —, calculabilă în funcție de morbiditățile — M_i — la vîrstele medii — V_i:

$$V_m = \sum_i V_i \cdot M_i / \sum M_i$$

Uneori alături de η (fracțiunea de susceptibili dintre nou-născuți) trebuie introdus încă un factor — λ — indicînd proporția de receptivi angrenabili efectiv în epidemii:

$$(M) = \lambda \cdot \eta \cdot (N)_{V_m}$$

În ceea ce-l privește pe M (proporția de bolnavi contagioși), el crește cu KMR din cauza contactelor eficiente dintre sursele de infecție și susceptibili (se neglijează decalajele temporare dintre contacte și apariția bolii, care sînt mici față de perioadele ciclurilor multianuale) și scade deoarece după un timp bolnavii se sterilizează (în majoritatea cazurilor, într-o unitate de timp egală cu durata medie a perioadei de contagiozitate).

Ecuaţia lui M devine :

$$\frac{dM}{dt} = (KR - 1) \cdot M$$

După cum au arătat anchetele pe eşantioane, valoarea medie a numărului de receptivi este invers proporţională cu transmisibilitatea şi direct proporţională cu vîrsta medie de îmbolnăvire. Valoarea medie nulă a mărimii oscilante $\frac{dM}{dt}$ explică regularitatea menţionată :

$$(R) = \frac{I}{K} \sim V_m$$

Din ecuaţia lui M rezultă că epidemia se va amplifica sau se va stinge, după cum (KR—1) este pozitiv sau negativ, după cum $R > (R)$ sau $R < (R)$. (R) reprezintă valoarea medie a variabilei.

Se explică astfel apariţia epidemiilor sezoniere sau ocazionale legate de creşterea temporară în anumite sezoane sau circumstanţe a transmisibilităţii, ce reduce media multianuală prag (R) sub valoarea numărului existent de receptivi — R.

În cazul unor variaţii mici în jurul mediilor multianuale evoluţia este de tipul unei oscilaţii armonice faţă de valorile iniţiale ale variabilelor, caracterizată :

— de amplitudinea A :

$$A^2 = \left(\frac{2\pi}{T}\right)^2 \cdot [R(0) - (R)]^2 + [M(0) - (M)]^2$$

— de perioada ciclului multianual :

$$T = 2\pi \cdot \sqrt{\frac{(R) \cdot \tau}{\lambda \cdot \eta \cdot N v_m}}$$

Excluzînd din morbiditate media sa multianuală se extrag componentele oscilante ; perioada lor — T — poate fi obţinută din maximele unei mărimi — autocorelogramei, calculabilă în funcţie de oscilaţiile menţionate (fig. 14-7).

Pentru o serie de viroze, T creşte odată cu perioada de contagiozitate şi scade cînd se intensifică procesul epidemiologic.

O analiză a ecuaţiei nesimplificate duce la o relaţie ceva mai exactă a oscilaţiei din planul (R, M) :

$$\frac{(R)}{2(M)} \cdot \left[\frac{R}{(R)} - 1\right]^2 + \left[\frac{M}{(M)} - 1\right] - \ln \frac{M}{(M)} = h$$

în care h = constant ; rezultă numărul total de îmbolnăviri asociat unui ciclu multianual : $\tilde{M} = \int_0^T M dt$ dependent de amplitudinea oscilaţiei.

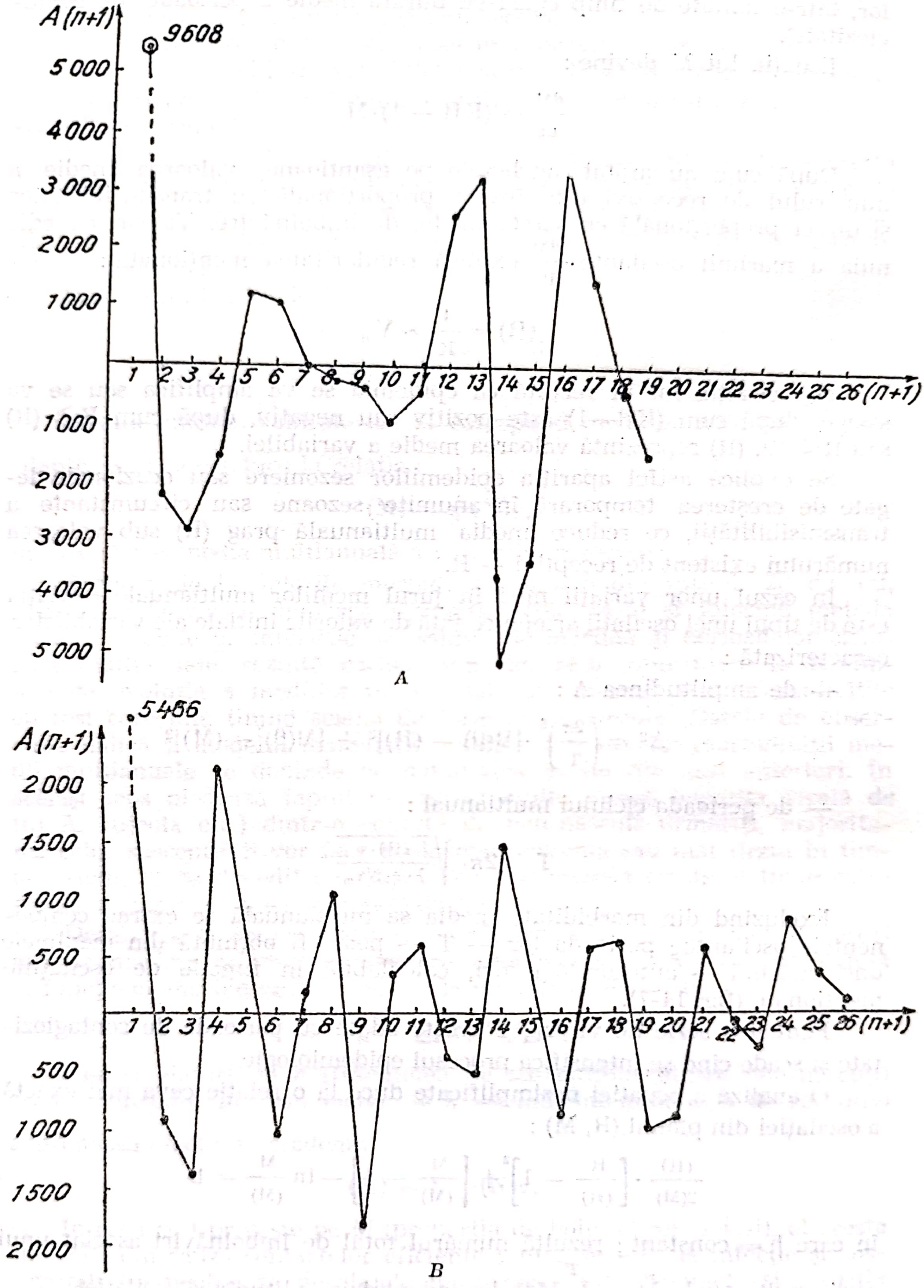
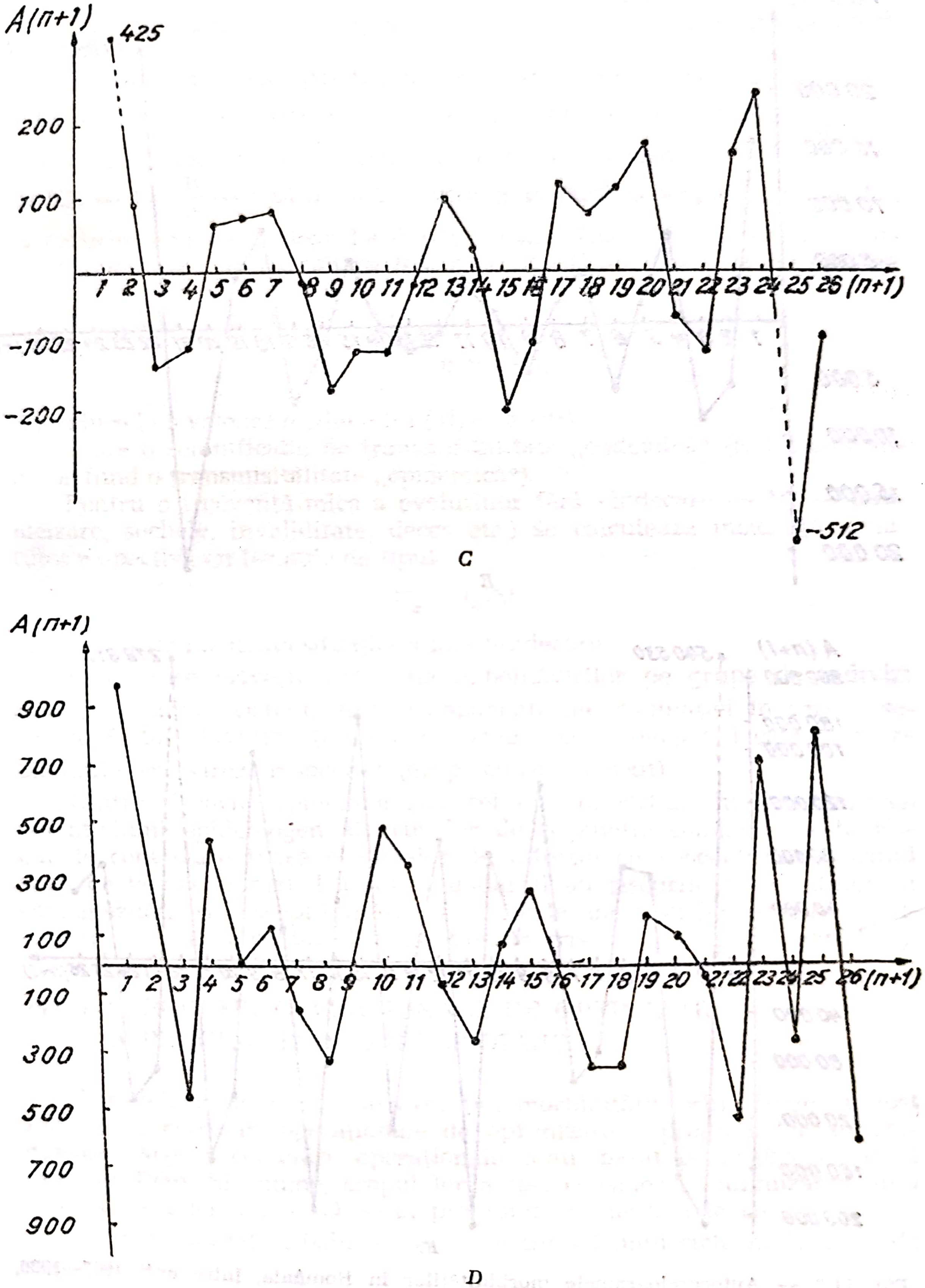
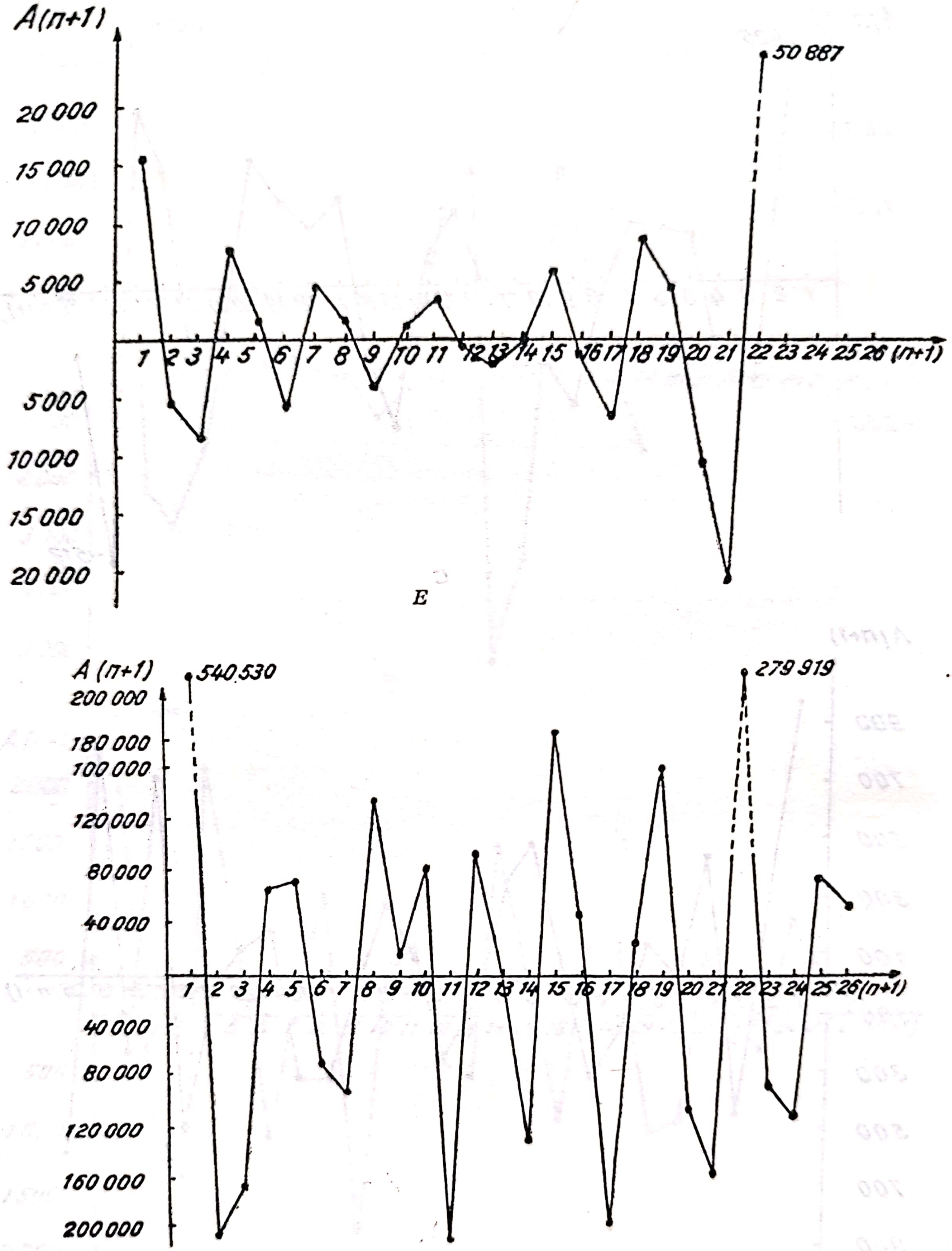


Fig. 14-7 — Autocorelogramele morbidităţilor în *A* — rubeolă ; *B* — parotidită epidemică ;



România, între anii 1967—1986, în unele boli virale.
C — varicelă ; *D* — hepatită virală ;



E

F

Fig. 14-7 — Autocorelogramele morbidităţilor în România, între anii 1967—1986, în unele boli virale.
E — gripă ; F — rujeolă.

Peste ciclicitatea multianuală se pot suprapune creșteri sezoniere și ocazionale ale lui M, legate (ca amploare și durată) de creșterile temporare ce fac pozitiv factorul de amplificare (KR—1) datorită creșterii lui K.

Ecuațiile anterioare pot fi mult simplificate în cazurile în care morbiditatea este relativ constantă, endemică. Este cazul în care $(R) = \frac{1}{K}$ este de ordinul de mărime al populației și deci nu mai poate crește, astfel încît $KR - 1 = \frac{R}{(R)} - 1$ să devină pozitiv și să ducă la amplificarea lui M; în cazurile endemice, doar local $(R) < R_{max}$. Cum M este relativ constant, putem să considerăm pe KM o constantă — θ — (probabilitatea îmbolnăvirii unui receptiv).

Ecuația lui M devine acum :

$$\frac{dM}{dt} = \theta \cdot R - M$$

și conduce la o valoare medie a lui $(M) = \theta \cdot (R)$.

θ are o semnificație de transmisibilitate „endemică“ (K folosită anterior fiind o transmisibilitate „epidemică“).

Pentru o frecvență mică a evoluțiilor fără vindecare — N_α — (cronicizare, sechele, invaliditate, deces etc.) se calculează incidența situațiilor respective cu formule de tipul :

$$N_\alpha = f_\alpha \cdot M$$

în care f_α este incidența situației α fără vindecare.

În ceea ce privește repartiția îmbolnăvirilor pe grupe de indivizi este importantă existența unor componente ale populației în care o serie de factori favorizanți cresc riscurile epidemiologice locale și morbiditățile prin viroza respectivă (grupe cu risc crescut).

Dintre riscurile epidemiologice cel mai important în determinarea potențialului epidemogen al grupelor de populație comparate este riscul de contactare fizică a surselor de infecție cu susceptibilii (variind mult de la caz la caz). Un rol secundar îl au riscurile de menținere a contagiozității și susceptibilității și riscurile de transfer efectiv al virusului cu ocazia contactelor menționate (riscuri mai puțin variabile).

14.6.3. CERCETĂRI OPERAȚIONALE DE OPTIMIZARE A PROGRAMELOR ANTIEPIDEMICE

Modelele matematice ale evoluției morbidității prin viroze au fost folosite în cercetări operaționale de optimizare a programelor antiepidemice. Aceste cercetări operaționale s-au bazat pe analize de tipul cost-beneficiu. Și anume, scopul lor a fost considerat minimizarea unui criteriu de eficiență — Q — al programelor menționate cu 2 termeni :

1. costul social al bolii — Q_1 — în timpul unui ciclu multianual de durata T :

$$Q_1 = a \cdot \int_0^T M dt$$

în care a = costul social mediu al unui caz de boală, ce ține seama de producția nerealizată, de neamortizarea cheltuielilor formative în timpul concediului medical, de pierderea de venit și cheltuielile curative ale familiei etc. ;

2. costul programului antiepidemic — Q_2 — implicînd prestații de diverse tipuri, de cost unitar — C_i — acordate în număr de — $\tilde{N}_i$ — pe unitatea de timp :

$$Q_2 = \sum_i C_i \cdot N_i$$

în care $N_i = \tilde{N}_i \cdot T$.

Beneficiul asociat programului este datorit reducerii primului termen Q_1, prin scăderea numărului de cazuri de boală ca urmare a prestațiilor antiepidemice.

În minimizarea menționată trebuie să ținem seama de o serie de restricții :

— consumurile — Q_μ — de tip μ (timp uman — t —, fonduri de medicamente, reactivi etc.) nu trebuie să depășească disponibilitățile, resursele — R_μ — ale rețelei epidemice repartizate pentru combaterea virozei respective. Consumurile Q_μ verifică restricțiile :

$$Q_\mu = \sum_i q_{\mu i} \cdot N_i \leqslant R_\mu$$

în care $q_{\mu i}$ = consumul specific de materiale (μ) pe prestații de tip α ;

— cazurile de o anumită gravitate trebuie neapărat tratate ($N_i \geqslant N_{i0}$) etc.

Prestațiile antiepidemice transformă stările naturale ale participanților la procesul epidemiologic (cu diverse riscuri asociate) în stări controlate (cu riscuri anihilate mai mult sau mai puțin complet).

Combaterea riscurilor de menținere a contaminării impune în primul rînd depistarea surselor de infecție ; prioritar se impune identificarea :

— bolnavilor contagioși (printre contacții unor foști bolnavi) ;

— purtătorilor aparent sănătoși de virus (printre convalescenții dispensarizați sau în populații selectate).

În măsura posibilului ar fi utile depistarea susceptibililor de protejat.

Implicit, precizîndu-se focarele se determină și o parte din vehiculii de transmitere, ce constituie obiectul operațiilor de decontaminare.

În continuare trebuie luate următoarele măsuri :

— măsuri de reducere a susceptibilității populației prin administrări de vaccinuri sau alte măsuri imunoprofilactice sau chimioprofilactice ;

— măsuri de decontaminare a posibililor vehiculi de transmitere (igienizare în focare și colectivități, educație sanitară adecvată) și măsuri de blocare pe diverse căi a transmisibilității prin instrumentar, aparatură medicală, obiecte de uz personal etc.

— măsuri curative ce asigură vindecarea și sterilizarea bolnavilor.

Prestațiile menționate mai sus au ca scop neutralizarea donatorilor potențiali de virus ;

— măsuri de reducere a riscului de contactare susceptibili — surse de infecție prin instituiri de baraje sanitare (spitalizarea bolnavilor cu manifestări clinice) sau prin educație sanitară vizînd evitarea aglomerărilor precum și diminuarea riscurilor de transfer efectiv cu ocazia contactelor fizice prin îmbunătățirea igienei individuale.

Alte prestații curative vizează riscurile de alterare severă a stării bolnavului prin tratare cu mijloacele adecvate (tabelul 14-II).

TABELUL 14-II

Valorile estimate pentru parametrii epidemiologici în cazul unor viroze de largă răspîndire

Viroza	Morbiditatea anuală necorectată	T_0 (ani)	t	γ	λ	η	f_{in}
Hepatită virală	240/300	4,3	28	0,44/0,44	1/1	1	7—16
Gripa	1 600/1 800	3,5	4	2,6 /2,16	1/1	1	0,3/0,2
Rujeolă	500/900	3	6	0,33/0,33	0,25/0,45	1	0
Rubeolă	120/200	3	6	0,08/0,13	0,06/0,10	1	0
Oreion	400/500	3	5	0,32/0,40	0,32/0,38	0,9	0,4
Varicelă	250/500	4	7	0,25/0,50	0,13/0,25	1	0

t = perioada de contagiozitate (în zile), ținînd seama de izolări și forme inaparente.
$\gamma = \frac{(R)}{Ro}$ reprezintă factorul de adaptare a lui (R) la viroza corectată ($Ro = 0,2$).
λ = fracțiunea susceptibililor efectiv angrenați în epidemie.
η = natalitatea ($^0/_{0000}$).
f_{in} = frecvența formelor inaparente.

Prestațiile antiepidemice pot fi caracterizate de :

— numărul prestațiilor — N_i — (pentru tipul i) ;

— numărul de beneficiari potențiali de prestații standard — B_i ;

— gradul de acoperire a necesităților de prestații :

$$n_i = N_i/B_i ;$$

— eficiența prestațiilor : reducerea relativă a parametrului epidemiologic de controlat — ε_π — față de valoarea necontrolată — $\varepsilon_{\pi 0}$ — (pentru un singur $n_i \neq 0$, unitar, $\varepsilon_\pi = \varepsilon_{\pi i}$).

Din cele de mai sus rezultă că :

$$\frac{\varepsilon_\pi - \varepsilon_{\pi 0}}{\varepsilon_{\pi 0}} = \sum\nolimits_i \varepsilon_{i\pi} \cdot n_i$$

În tabelul 14-III sînt prezentate valorile parametrilor menționați în cazul prestațiilor de prevenire și combatere a hepatitelor virale.

TABELUL 14-III

Prestații antiepidemice uzuale în combaterea hepatitei virale și caracterizarea lor

Tipul prestației	Eficiența prestației	Numere optime de prestații necesare	Capacitatea rețelei de a acoperi aceste prestații
Supraveghere contacți	0,88	$7 \cdot 10^4$	17%
Imunochimioprofilaxie	0,40	$12 \cdot 10^4$	35%
Intervenții în focare	0,38	$8 \cdot 10^4$	27%
Spitalizări	0,90	$8 \cdot 10^4$	27%
Dispensarizări convalescenți	0,35	$8 \cdot 10^4$	16%
Depistarea purtătorilor	0,33	10^6	8%
Decontaminări	0,60	$4 \cdot 10^5$	43%
Igienizări	0,35	$6 \cdot 10^5$	24%
Educație sanitară	0,18	$9 \cdot 10^4$	14%

Prin relațiile ce exprimă variabilele și parametrii epidemiologici în funcție de numerele de prestații antiepidemice, costul social al bolii — (Q_1) — devine implicit o funcție (neliniară) de N_i, iar Q_2 — o funcție liniară de N_i (ca și restricțiile menționate).

Minimizarea lui $Q = Q_1 + Q_2$ cu restricțiile menționate se poate face în 2 moduri :

— prin campanii discontinue, concentrate în intervale mici de timp (Δt) ; sînt influențate doar valorile inițiale ale variabililor R, M ; variabilele respective devin :

$$R^*(0) = R(0) - E_i \varepsilon_{Ri} \cdot V_i \cdot \Delta t$$

$$M^*(0) = M(0) \cdot \exp[-E_j k \cdot \varepsilon_{kj} \cdot B_j^{-1} \cdot S_j \cdot \Delta t \cdot R(0)]$$

în care V_i și S_j sînt numerele de prestații de tip i sau j pe unitățile de timp ce reduc pe R(O), respectiv pe K.

— prin campanii continue sînt influențate în special valorile medii ale lui R și M :

$$(R) = \frac{1}{K - E_j K \cdot \varepsilon_{kj} \cdot B_j^{-1} \cdot S_j}$$

$$(M) = \lambda \cdot (\eta \cdot N_{vm} - E_i \varepsilon_{Ri} \cdot V_i)$$

Valorile optime ale numerelor de prestații le-am prezentat într-o serie de lucrări (publicate în *Rev. Roum. Méd., Virol.*). Ne vom limita la cîteva observații.

Pentru a obține o reducere semnificativă a morbidității fără o creștere exagerată a costului programelor antiepidemice, activitatea respectivă trebuie orientată în anumite direcții de eficiență maximă care nu implică nici consumuri și nici costuri exagerate.

La un cost social mediu al unei hepatite virale A de cca 40 000 lei, pentru un vaccin costînd în jur de 500 lei și acordînd o protecție de

80%, administrarea a cca 200 000 de doze ar duce la un beneficiu de 0,5 miliarde lei (de cca 5 ori mai mare decît costul vaccinului respectiv) ; cercetarea operațională arată că nu este necesară o vaccinare exhaustivă a susceptibililor pentru o reducere marcată a morbidității, fiind necesară doar aducerea lui R sub pragul (R) asociat declanșării epidemiei.

Și în cazul altor prestații, cercetări operaționale de acest tip pot duce la o mult mai eficientă folosire a resurselor și la o creștere marcată a eficienței eforturilor antiepidemice.

Bibliografie selectivă

ALWARD WALLACE L. M. și colab. — J. Infect. Dis., 1985, 151, 4, 604—609.
ANESTAD G. — Epidemiol. Infect., 1987, 99, 2, 523—531.
ANGHELESCU S., ATHANASIU P. și colab. — Rev. Roum. Méd., Virol., 1986, 37, 3, 157—165.
ANTSUPOVA H. S., ALTOVA E. E. și colab. — Z. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., 1988, 5, 34.
ARDELEAN I., BARNEA M. — Elemente de biometeorologie medicală, Edit. Medicală, București, 1972.
ATHANASIU P. — Rev. Roum. Méd., Virol., 1985, 36, 4, 295—301.
BLACKMAN J. A., MURPH J. R., BALE J. F. jr. — Pediatr. Infect. Dis., 1987, 6, 8, 725—729.
CANDA R., PRASTHOFER E. E. și colab. — J. Med. Virol., 1987, 23, 1, 41—49.
CĂRUNTU F., CĂRUNTU V. — Vademecum de boli infecțioase, Edit. Medicală, București, 1979.
CERNESCU C., CAJAL N. — Rujeola, Edit. Academiei R.S.R., București, 1976.
CERNESCU C., CAJAL N. — Virusuri lente, Edit. Academiei R.S.R., București, 1986.
CHAMPSAUR H. și colab. — J. Infect. Dis., 1984, 149, 5, 667—674 și 675—682.
CONRAD M. E. și colab. — J. Infect. Dis., 1987, 156, 1, 56—63.
COTOI F. și colab. — Rev. Roum. Méd., Virol., 1983, 34, 4, 251—256.
CRISTEA AL., COPELOVICI Y. și colab. — Rev. Roum. Méd., Virol., 1988, 39, 2, 103—119.
CRISTEA AL. — Rev. Roum. Med., Virol., 1981, 32, 4, 281.
CRISTEA AL., COPELOVICI Y. și colab. — Rev. Roum. Méd., Virol., 1988, 39, 2, 103.
CRISTEA AL., PAVEL A., COPELOVICI Y. — Rev. Roum. Méd., Virol., 1981, 32, 4, 9.
CRISTEA AL. — Rev. Roum. Méd., Virol., 1982, 33, 2, 89.
CRISTEA AL., COPELOVICI Y. și colab. — Rev. Roum. Méd., Virol., 1978, 29, 2, 93.
COBAN V., MIHAIL A. și colab. — Rev. Roum. Méd., Virol., 36, 2, 79—83.
DIZER H. și colab. — Zent. bl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg., Ser. *B*, 1988, 185, 6, 548—559.
DOWSETT E. G. — J. Hosp. Infect., 1988, 11, 2, 103—115.
DRUSIN L. M. și colab. — Arch. Dis. Child., 1987, 62, 7, 690—695.
DUCA E., DUCA M., FURTUNESCU G. — Microbiologia medicală, Edit. Didactică și Pedagogică, București, 1979.
DUFEY J., EVRARD G. — Ann. Méd. Vét., 1985, 129, 4—5, 263—274.
FREIMUTH F. și colab. — Sem. Hôp. Paris, 1987, 63, 46, 3 593—3 601.
GLANSER M. P., FRANCIOLI P. — Eur. J. Clin. Microbiol., 1984, 3, 1, 55—58.
GOUDEAU A., DUBOIS F., ROLLAND J. C. — Presse Méd., 1984, 13, 38, 2 321—2 322.
GOVINDARAJAN J. și colab. — Am. J. Clin. Pathol., 1988, 89, 2, 233—237.
GRIFFITHS P. D., GRUNDY J. E. — Epidemiol. Infect., 1988, 100, 1—15.
HOPE SIMPSON R. E. și colab. — Epidemiol. Infect., 1987, 99, 1, 5—54.
ISAIA G., TEODOSIU O. și colab. — Rev. Roum. Méd., Virol., 1985, 36, 3, 175—181.
ISAIA G., TEODOSIU O. și colab. — Rev. Roum. Méd., Virol., 1985, 36, 3, 175—179.
IVAN A., IONESCU T., DUDA R. — Epidemiologie generală, Edit. Medicală, București, 1980.

15.

Diagnosticul de laborator al infecţiilor virale

15.1. GENERALITĂŢI ASUPRA IMPORTANŢEI IDENTIFICĂRII INFECŢIILOR VIRALE

Identificarea infecţiilor virale, în condiţiile dezvoltării continue a posibilităţilor de prevenire şi tratament, a căpătat astăzi o importanţă deosebită atît pentru bolnav, cît şi pentru colectivitate; ea se impune mai ales:

— în infecţiile în care diagnosticul corect poate indica atitudinea şi medicamentele cele mai eficace pentru condiţia bolnavului (de exemplu, administrarea de chimioterapice adecvate în infecţiile herpetice — mai ales în cazul keratitelor ce pot duce la orbire —, ca şi atitudinea impusă de infecţia rubeolică în primul trimestru de sarcină);

— în infecţii ce afectează colectivitatea şi care pot fi stăpînite sau măcar limitate prin măsuri adecvate de carantinare, chimioprevenţie, imunizare etc. (de exemplu, în infecţii, de la cele deosebit de periculoase — variola sau febra galbenă — la unele socotite chiar banale — gripa — dar cu extindere rapidă în populaţie, precum şi la unele cu evoluţie extrem de gravă pentru individ — infecţii cu virusuri Ebola, Lassa sau Marburg — ca şi, mai recent individualizat, SIDA).

Identificarea infecţiilor virale se realizează prin coroborarea datelor furnizate de clinician, epidemiolog şi de către laborator. Diagnosticul clinic şi epidemiologic este de multe ori discutabil sau chiar eronat (aspecte clinice şi epidemiologice similare pot fi determinate de virusuri diferite, după cum acelaşi virus poate determina variate manifestări clinice sau epidemiologice); cu toate acestea, chiar şi astăzi, uneori, satisface şi este suficient pentru clinician şi epidemiolog (de exemplu, în forme tipice de parotidită sau rujeolă în colectivităţi în care aceste infecţii au fost deja recunoscute; adesea, într-un focar epidemic cu etiologie deja precizată, chiar formelor atipice li se stabileşte un diagnostic corespunzător).

Dacă într-o epocă nu prea îndepărtată era dificil să se asigure diagnosticul unor infecţii virale, progresele realizate de către cercetarea şi practica medicală, ca şi folosirea realizărilor fundamentale şi aplicative din numeroase alte domenii ştiinţifice permit laboratorului să stabilească un diagnostic corect şi rapid, util pentru clinician şi epidemiolog, şi mai ales pentru bolnav şi colectivitate. Laboratorul de specialitate a clarificat în ultimele decenii sindroame nebulos etichetate, ca „meningită aseptică“, „infecţii acute respiratorii“ — ale căilor superioare sau pneumonii —, „boală diareică nebacteriană“. Identificarea infecţiilor virale lente cu implicare în afecţiuni neurologice ca PESS, parkinson etc., ca şi în SIDA demonstrează din plin posibilităţile prezente în laboratorul de virusologie.

Pe lîngă situaţiile amintite anterior, laboratorului îi revin astăzi şi alte sarcini importante pe care le poate rezolva cu ajutorul posibilităţilor tehnice pe care le are la îndemînă :

— stabilirea prevalenţei şi a distribuţiei anumitor virusuri în colectivitate şi deci a perspectivelor epidemiologice pe plan local sau general (de exemplu, supravegherea seroepidemiologică în cazul infecţiei gripale) ;

— stabilirea profilului imunologic al populaţiei ca urmare a acţiunilor de imunizare (de exemplu, anchete seroepidemiologice şi urmărirea circulaţiei virusurilor sălbatice, eventual şi a celor vaccinante în colectivitate, în cazul infecţiei poliomielitice) ;

— recunoaşterea naturii virale a unor îmbolnăviri (sindroame) încă nerezolvate ;

— în fine, numai laboratorul poate identifica virusuri prezente în mediul exterior (apă, sol, aer, alimente etc.) şi asigură controlul unor preparate biologice (în special de provenienţă umană — preparate de sînge şi derivate) pentru evitarea răspîndirii unor virusuri, precum cele hepatitice sau ale sindromului de imunodeficienţă.

Referitor la performanţele laboratorului în stabilirea diagnosticului etiologic viral, subliniem :

— posibilitatea sesizării unor etiologii „atipice“ în afecţiuni prezentate în forme clinice caracteristice (de exemplu, „parotidita epidemică“ produsă de alte virusuri în afara celui urlian) (tabelul 15-I) ;

TABELUL 15-I

Virusuri identificate în etiologia unor forme clinice tipice de parotidită epidemică

Virus	Indicaţii bibliografice
Virus gripal A	Brill (1977)
Virus paragripal 3	Buckley (1972) ; Zollar (1979) ; Cullen (1980) ; Meurman (1983)
Virus Coxsackie	Howlett (1957)
Virusul coriomeningitei limfocitare	Lewis (1961)

— posibilitatea unui diagnostic etiologic chiar atunci cînd virusul — deşi prezent în probele provenind de la bolnav — nu este cultivabil şi deci nu poate fi (încă) izolat şi identificat (de exemplu, adenovirusuri implicate în afecţiuni diareice) ; mai mult decît atît, chiar dacă virusul nu se exprimă prin componente în măsură a fi recunoscute prin procedeele imunologice sau virionul nu există ca atare spre a fi recunoscut morfologic, identificarea fragmentelor genomice libere sau integrate rezolvă situaţia printr-un procedeu modern de hibridizare.

Activitatea laboratorului de virusologie în scopul stabilirii etiologiei virale a unei infecţii se desfăşoară în două direcţii principale :

— identificarea virusului sau a componentelor sale în probele recoltate de la bolnav (sînge, LCR, urină, fecale, ţesuturi etc.) ; se înțelege că aceasta se referă și la probele recoltate de la animale, probele de sol, aer, apă etc. ;

— determinarea răspunsului sistemului imunitar al organismului la agresiunea virală, indiferent că este vorba de răspunsul celular sau — mai ales — de cel umoral.

Într-o epocă mai îndepărtată din scurta istorie a virusologiei, diagnosticul de laborator se baza pe izolarea și identificarea virusului în cauză prin inocularea unor sisteme biologice sensibile — respectiv animale de laborator și ouă embrionate —, la acestea adăugîndu-se în ultimele decenii și culturile de celule. Cercetarea unor eventuale activități sau antigene virale direct în probele provenind de la bolnav nu se putea efectua decît în anumite cazuri, datorită reduselor mijloace de identificare (de exemplu, determinarea activității hemaglutinante în secrețiile nazofaringiene în cursul infecțiilor gripale și identificarea ei prin hemaglutinoinhibare, ca și recunoașterea unor antigene virale în probele recoltate din leziuni cutanate prin reacții de fixare a complementului sau reacții de precipitare în infecții herpetice sau poxvirale), chiar și cele folosite avînd o sensibilitate limitată.

Procesul de izolare și de identificare a virusurilor era însă de durată, rezultatul investigației nemaiavînd interes practic ; de altfel, numeroase virusuri nu puteau fi cultivate în condițiile existente atunci, după cum și astăzi unele încă nu sînt cultivabile sau se pot izola numai prin folosirea unor procedee speciale.

În privința aprecierii răspunsului sistemului imunitar, pe lîngă unele probe intradermice corelate cu implicarea celulară, folosirea unor procedee serologice s-a dovedit insuficientă (baterie de antigene restrînsă, sensibilitate redusă etc.). Rezultatele unei singure determinări serologice nefiind concludente, investigarea bolnavilor în dinamică duce la întîrzierea răspunsului dat de laborator, care devine astfel de un interes pur academic.

Ultimele decenii au fost marcate de importante progrese științifice și tehnice în cele mai variate domenii (Cajal, 1983) ; în ultimă instanță, acestea au condus la completarea și dezvoltarea activității de investigare în virusologie, respectiv la ameliorarea esențială a diagnosticului ; etape principale pot fi considerate :

— introducerea microscopiei electronice în studiul și diagnosticul virusologic, în cursul anilor '40 ;

— folosirea, începînd cu anii '50, a imunofluorescenței ;

— dezvoltarea cantitativă și calitativă a celulelor *in vitro*, în monostrat sau în suspensie ;

— realizarea marcării antigenelor virale și a anticorpilor cu izotopi radioactivi și enzime, cu folosire în procedee de mare sensibilitate ;

— în fine, în plină desfășurare se află procesul de introducere, în procedeele de diagnostic curent al infecțiilor virale, a anticorpilor monoclonali ca și a unor tehnologii de inginerie genetică, respectiv metodologia hibridizării fragmentelor genomice virale.

Concomitent, diagnosticul de laborator a beneficiat în mod deosebit de perfecţionarea continuă a aparaturii de laborator şi, în acelaşi timp, de aceea a unor procedee deja utilizate, prin miniaturizare, automatizare etc.

Avînd astăzi la dispoziţie procedee de mare sensibilitate, laboratorul de diagnostic virusologic şi-a modificat strategia :

— Probele recoltate în mod special pentru aceasta sînt investigate în primul rînd cu mijloace care să evidenţieze particulele virale, antigenele sau chiar fragmente genomice.

— Concomitent, sau în scopul confirmării rezultatelor investigaţiilor precedente, şi mai ales cînd acestea nu au avut succes, probe recoltate în condiţii adecvate se inoculează în sistemele biologice sensibile, iar după replicarea virală şi acumularea de produse proprii virusului, acestea servesc la identificarea sa.

— Cercetarea modificărilor imunologice determinate de către infecţia virală foloseşte mai puţin, pentru nevoile diagnosticului, procedee adresate aspectului celular (de exemplu, procedee *in vitro,* ca inhibarea migrării leucocitelor, rozetarea etc. sau chiar cele reprezentate de probele intradermice) ; în mod curent, se investighează modificările umorale prin reacţii serologice adecvate infecţiei presupuse, perioadei în care se află aceasta sau pentru stabilirea activităţii prezente sau deja trecute a infecţiei.

În rezolvarea acestui program strategic, laboratorul foloseşte procedee aflate în arsenalul său, de obicei mai multe concomitent sau chiar numai unul singur, în măsura în care prin aceasta se asigură rapid şi sigur recunoaşterea infecţiei virale.

În acest sens trebuie să se ţină seama de următoarele (Jawetz, 1987) :

— Prezenţa virusului şi izolarea sa nu înseamnă neapărat că el este cauza îmbolnăvirii ; unele virusuri persistă în organismul uman perioade îndelungate şi izolarea lor poate să nu aibă o legătură directă cu îmbolnăvirea (de exemplu, enterovirusuri sau virus herpetic) ; aceasta impune investigări aprofundate pentru stabilirea responsabilităţii sale în tabloul clinic respectiv.

— Infecţiile duble pun de asemenea probleme şi impun investigări serologice faţă de ambele virusuri identificate la aceeaşi persoană.

— În fine, laboratorul efectuează determinări complementare, dintre care unele pot fi considerate ca indicatoare ale unei infecţii virale în general, fără să permită vreo precizare etiologică anume : anumite modificări ale profilului enzimelor serice ; prezenţa interferonului în LCR (Flowers şi Scott, 1985 ; Ioniţă şi colab., 1988) ca şi apariţia anticorpilor faţă de interferon (Pozzetto şi colab., 1984) ; modificări ale hemoleucogramei, VSH, concentraţiei de imunoglobuline, citologiei LCR pot sugera uneori o infecţie virală ; creşterea concentraţiei de proteină C reactivă pare mai degrabă legată de caracterul leziunilor concomitente (Selim, 1987 ; Strati, 1988).

15.2. DESFĂȘURAREA ACTIVITĂȚII DE DIAGNOSTIC DE LABORATOR AL INFECȚIILOR VIRALE

În realizarea diagnosticului de laborator se disting mai multe etape: corecta desfășurare a activității proprii fiecărei etape condiționează calitatea diagnosticului infecției virale, prin aceasta înțelegîndu-se precocitate, rapiditate, sensibilitate.

15.2.1. RECOLTAREA PROBELOR NECESARE EFECTUĂRII DIAGNOSTICULUI DE LABORATOR

Eficiența examenului de laborator ține în primul rînd de recoltarea corectă a probelor de la bolnav, ca și de la diferite alte rezervoare sau vectori de virus ori elemente de mediu exterior (aer, apă, sol, reziduuri lichide sau solide, diferite obiecte).

În cazul recoltării probelor de la bolnav trebuie să se țină seama: *cînd, de unde* și *cum* se recoltează.

— *Cînd* înseamnă că trebuie să se cunoască stadiul și perioada în care virusul este prezent în organism și poate fi abordat. În mod obișnuit, la sfîrșitul perioadei de incubație și, uneori, aproape pe întreaga perioadă de stare a bolii, virusul poate fi recuperat de la bolnav, bineînțeles în funcție de mecanismul patogenic propriu și de manifestările clinice ale infecției (de exemplu, în infecții arbovirale virusul poate fi recuperat din sînge numai în primele zile de boală, dar în variolă — datorită leziunilor cutanate și mucoase — virusul poate fi izolat pînă la căderea ultimei cruste). De asemenea, pentru diagnosticul serologic se impune cunoașterea perioadelor de apariție precum și evoluția nivelurilor diferitelor activități anticorp (de exemplu, neutralizare, fixare de complement etc.) în corelație cu prezența anticorpilor în cadrul anumitor clase și subclase de imunoglobuline serice (tabelul 15-II).

TABELUL 15-II

Posibilitatea de decelare a virusurilor sau a anticorpilor în diferite stadii de boală
(modificat după Jawetz, 1987)

Perioada	Decelerarea virusului sau a unor componente virale	Decelarea anticorpilor
Incubație	uneori, la sfîrșitul ei	nu
Debut	de obicei	eventual chiar în prima zi de boală cu procedee foarte sensibile
Perioadă de stare	de cele mai multe ori	de obicei
Perioadă de recuperare	uneori, în anumite infecții	de obicei
Convalescență	rareori, în anumite infecții	de obicei

— *De unde* se referă la cunoașterea patogeniei infecției respective. În general, în afecțiunile respiratorii virusul este prezent în secrețiile nazofaringiene, în cele oculare — în secreția conjunctivală și uneori în lacrimi ; în infecțiile cu manifestări eruptive, virusul se izolează din materialele recoltate de la nivelul acestora (de exemplu, lichid vezicular — virus herpetic sau variolic) dar, frecvent, leziunile mucoaselor evoluînd concomitent fac ca virusul să fie prezent în concentrație mai mare în secreția faringiană (de exemplu, variolă, rujeolă). Infecții ale sistemului nervos central au permis izolarea virusurilor din LCR (enterovirusuri, virus urlian etc.), din material bioptic local (arbovirusuri, virus herpetic) sau chiar din fecale (enterovirusuri). În numeroase infecții virusul se izolează din sînge în cursul viremiei de la sfîrșitul perioadei de incubație (de exemplu, în variolă). Uneori, virusurile se izolează din urină (virus urlian, virus citomegalic) (tabelul 15-III).

TABELUL 15-III

Probe recoltate de la bolnav pentru izolarea virusului

Afecțiunea	Produs biologic ce se recoltează	Decelarea antigenelor provenind de la virusuri
Afecțiuni ale căilor respiratorii superioare	— secreții nazale, aspirat sau tampon faringian, spălătură nazofaringiană	rhino, gripale, paragripale, RSV, adeno, REO, entero
	— fecale	adeno, REO, entero
Afecțiuni ale căilor respiratorii inferioare	— spută, tampon faringian, aspirat bronșic (țesut pulmonar, post-mortem)	gripale, paragripale, adeno, RSV
Afecțiuni eruptive	— lichid vezicular	vaccinal, variolic, herpetic, varicella-zoster, entero
	— tampon faringian	entero, rujeolic, rubeolic, variolic
	— fecale	entero
	— sînge	rujeolic, rubeolic, variolic
Afecțiuni diareice	— fecale	rota, adeno, corona
Afecțiunile SNC	— LCR	entero, herpetic, urlian, unele arbo
	— sînge	arbo
	— fecale	entero
	— tampon faringian	entero, herpetic, urlian
	— salivă	rabic
	— creier (biopsie post-mortem)	toate menționate
Parotidită	tampon faringian	urlian, CMV, paragripal 3
Conjunctivită (keratoconjunctivită)	tampon conjunctival, lacrimi	herpetic, adeno, entero, vaccinal
Afecțiuni severe, hemoragice	sînge	arbo, arena ; Marburg, Ebola, Lassa
SIDA	sînge	HIV

— *Cum* se recoltează are foarte mare importanţă ; în primul rînd trebuie ca recoltarea să se facă în funcţie de procedeul de laborator preconizat : izolarea virusului necesită un material recoltat steril, fără să i se adauge prezervant cu activitate antivirală, dar şi cînd materialul este destinat unor probe imunologice sau de hibridizare trebuie să se evite anumite substanţe care afectează structura virală (de exemplu, mertiolatul modifică antigenicitatea virusului poliomielitic). De asemenea, dacă pentru izolarea virusurilor materialele recoltate pot fi introduse în anumite medii de conservare şi transport, acest lucru nu este indicat atunci cînd se are în vedere un examen microscopic (obişnuit sau electronic) sau unul bazat pe principii imunologice.

Recoltarea probelor de la bolnav se face în funcţie de produs : puncţie (sînge, LCR, lichid vezicular), spălătură (nazofaringiană), tampon (secreţii conjunctivale, nazofaringiene sau vaginale şi uretrale), eliminare directă (fecale, urină, spută) sau recoltare cu sonda (urină), raclare de leziuni cutanate sau prelevare de cruste, biopsie (creier, ficat, ganglioni limfatici) ; post-mortem se recoltează fragmente de organ (creier, ficat, rinichi, plămîn, splină, ganglioni limfatici) sau conţinut intestinal (tabelul 15-IV).

TABELUL 15-IV

Strategia diagnosticului de laborator în infecţiile virale

Perioada de boală	Probe recoltate de la bolnav	Procedee utilizate
Debut, primele zile de boală	Probe pentru investigarea prezenţei virusului sau a antigenelor sale (secreţii, leziuni cutanate, LCR, fecale, urină, probe bioptice, sînge etc.) Sînge	*a*) Procedee de stabilire a prezenţei virusului sau a antigenelor sale *b*) Inoculare pentru izolarea virusului c) Identificare de anticorpi — clase de imunoglobuline. Stocare pentru determinări pe probe duble
Perioadă de stare	Uneori probe din leziuni care conţin material viral (leziuni cutanate, în special) Sînge	*a*), *b*) *c*)
Perioadă de recuperare şi convalescenţă	Sînge	Determinări serologice pe probe duble

15.2.2. TRANSPORTUL PROBELOR LA LABORATOR

Experienţa a demonstrat că pentru izolarea virusurilor inocularea imediat după recoltare („la patul bolnavului“) asigură cele mai bune rezultate.

Numeroase medii de transport au fost recomandate pentru a permite supravieţuirea virusurilor o perioadă mai îndelungată şi/sau la temperaturi mai ridicate decît cea de +4°C și chiar la cea a camerei: mediu cu bentonită (tampon salin — ser de iepure — bentonită), mediu cu cărbune, mediu cu lapte, mediu Eagle cu ser de pui, bulion — triptoză — fosfat etc.; supraviețuirea diferitelor virusuri nu este aceeași în toate mediile recomandate, ceea ce impune o folosire simultană a mai multor tipuri de astfel de medii de transport.

În absența mediilor de transport, materialele recoltate se transportă la laborator cît mai repede (cîteva ore) și la rece (+4°C și preferabil la temperaturi de —20° sau —70°C); atunci cînd fragmentele de țesuturi sau organe urmează să fie puse în cultură sau se prevede izolarea virusului citomegalic din urină, acestea nu se congelează.

Păstrarea materialelor în laborator se face, ca și pentru transport, în stare de congelare; temperatura cea mai indicată este cea de —70°C, dar și folosirea congelatorului obișnuit (—20°C) permite menținerea viabilității virusurilor; important este ca materialul să nu fie decongelat de mai multe ori, operațiunea avînd acțiune nocivă asupra virusurilor (de altfel, nici pentru probele de ser recoltate în vederea efectuării unor investigații serologice nu este indicată decongelarea repetată).

Atunci cînd urmează să fie folosite în diverse procedee de diagnostic — indiferent dacă este vorba de izolare, de evidențiere a virusului sau a antigenelor sale, ca și pentru examene serologice — materialele recoltate se prelucrează în mod adecvat. În primul rînd este necesară o clarificare a lor, ceea ce se realizează prin centrifugare sau filtrare; în același fel se clarifică și materialele care se suspensionează în vederea examenului (de exemplu, fecale, cheag de sînge, fragmente de organe). Importantă este apoi îndepărtarea bacteriilor și fungilor, mai ales atunci cînd urmează a se inocula pe culturi de celule, ouă embrionate și chiar pe animale; tratarea suspensiilor implică folosirea antibioticelor sau a unor reactivi (de exemplu, eter în cazul unor virusuri eter-rezistente). Inactivarea se impune și atunci cînd în suspensia ce urmează să fie examinată există virusuri deosebit de periculoase (de exemplu, în cazul virusului variolic, pentru prepararea suspensiei s-a recomandat o soluție conținînd formol, ca și iradiere în ultraviolet a preparatelor ce se examinează microscopic).

În orice caz trebuie să se aibă în vedere că o clarificare prin centrifugare duce uneori la o importantă pierdere de material viral antrenat odată cu particulele mari (de exemplu, în cazul solului se produce o puternică adsorbție a virusurilor pe particule); de asemenea, antibioticele adăugate suspensiilor ca și cele destinate mediilor de culturi celulare nu trebuie să afecteze virusurile prezente.

15.2.3. PROCEDEE PENTRU IDENTIFICAREA VIRUSULUI, A ANTIGENELOR ȘI A ALTOR COMPONENTE VIRALE

a) Recunoașterea virusului în materialele recoltate de la organismul implicat se realizează în primul rînd prin examinarea preparatelor prin *microscopie electronică (ME)* directă sau folosind una din variantele sale în care prin adăugarea anticorpilor corespunzători se ameliorează procedeul, favorizîndu-se aglomerarea virionilor și depunerea lor pe grilă *(imunomicroscopie electronică simplă — IME)* sau „capturarea“ lor pe grilă (varianta SPIEM). Diferenţierea electronooptică a virusurilor realizată de Nagler şi Rake, încă din 1948, nu a fost însă accesibilă diagnosticului curent decît după introducerea coloraţiei negative, cu avantaje deosebite : prelucrare rapidă, evidenţiere a particulei virale cu caracteristici proprii virusului în cauză, mare sensibilitate.

ME şi variantele sale au reprezentat procedeul cel mai rapid prin care au fost identificate ultimele focare de variolă de import din Europa şi — după ce au contribuit la recunoaşterea virusului în cauză la numeroase infecţii — reprezintă şi astăzi mijlocul preferat pentru diagnosticul de laborator în unele afecţiuni (de exemplu, diareea virală) precum şi procedee de referinţă pentru noi metodologii.

Cu caracter istoric se prezintă posibilitatea, acceptată la vremea respectivă şi de specialiştii OMS în cazul diagnosticului variolei, de a se evidenţia particule virale, bineînţeles, de dimensiuni mari, prin colorarea preparatelor (frotiuri, amprente) din materialul recoltat de la bolnav folosind procedee simple (Giemsa, Sellers, izamină fenicată etc.) Acestea se mai utilizează în unele laboratoare pentru evidenţierea incluziilor rabice în cursul diagnosticului, dar şi în acest domeniu imunofluorescenţa tinde să rămînă procedeul acceptat peste tot ; uneori, se mai folosesc coloraţii simple pentru demonstrarea incluziilor virale la nivelul celulelor în care s-a replicat virusul, mai ales după inocularea culturilor de celule.

b) O modalitate larg acceptată şi folosită în laboratoarele de diagnostic constă în recunoaşterea antigenelor virale prezente în materialele recoltate de la bolnav, eventual concomitent cu demonstrarea particulelor virale prin ME, dar de obicei tocmai datorită inaccesibilităţii acesteia din urmă ; de altfel, în materialele examinate uneori nici nu se pot identifica particulele virale, ci numai componente rezultate în cursul replicării lor în organism sau eliberate ca urmare a distrugerii virionilor, care sînt recunoscute prin caracterele lor antigenice. Procedeele care realizează această recunoaştere se adresează fie antigenelor ce se află în celulele în care s-au replicat virusurile, fie antigenelor care se găsesc în afara acestor celule ca urmare a difuzării lor sau a distrugerii suportului celular ; frecvent acest material antigenic este reprezentat şi de particulele virusului corespunzător, nu numai de antigene solubile.

— Identificarea antigenelor virale în interiorul celulelor implică prezenţa acestora din urmă în materialul recoltat de la bolnav ; celulele etalate pe lamă se tratează cu anticorpii care poartă un marker în măsură să indice ulterior poziţia lor la nivelul celulei unde s-a produs reacţia antigen — anticorp.

Substanţele folosite în mod curent pentru marcare sînt fluorocromi (cel mai frecvent izotiocianatul de fluoresceină) sau enzime (dintre acestea s-a impus peroxidaza) ; fără utilizare obişnuită în laboratorul de diagnostic, ca markeri se pot folosi şi izotopi radioactivi (imunomicroradiografiere) sau substanţe electronoopace (de exemplu, feritina).

În cazul marcării anticorpilor cu fluoresceinizotiocianat (ITCF), vizualizarea complexului anticorpi—antigen viral la nivelul celulei se obţine prin fluorescenţa consecutivă excitării fluorocromului cu radiaţie ultravioletă — *reacţia de imunofluorescenţă (IF)* ; localizarea peroxidazeimarker se realizează prin produsul colorat ce se formează la nivelul celulei consecutiv acțiunii enzimei asupra unui substrat adecvat — *reacția imunoperoxidazică (IPO).*

Ambele procedee se adresează unei game diverse de afecțiuni (respiratorii, cutanate, genitale sau cu alte localizări) în care sînt implicate numeroase virusuri ; rezultatele lor se corelează în general bine cu cele obținute prin procedeele de izolare a virusurilor și au avantajul că se obțin rapid, fiind accesibile laboratoarelor cu o dotare mai redusă (în special IPO, care necesită numai microscopul obișnuit).

— Deosebit de largă utilizare are astăzi diagnosticul bazat pe identificarea antigenelor virale aflate în afara celulelor, gama produselor patologice ce pot fi examinate astfel fiind mult mai cuprinzătoare decît aceea pe care o asigură IF și IPO.

Principalele procedee preconizate au principii diferite : așa cum reiese dintr-un memorandum întocmit de specialiștii OMS (1984), unele procedee evidențiază reacția antigen — anticorp care se petrece la nivelul unui suport solid (de exemplu, materiale sintetice — polimeri, precum polistiren sau polivinil ; sticlă îmbrăcată cu un strat subțire de metal, ca indiu sau tantal ; metale siliconate ; hematii sau chiar bacterii, precum stafilococul Cowan I), în timp ce altele se desfășoară în soluție.

Unele procedee din prima categorie se desfășoară pe suprafața oferită de materialele menționate, indiferent de aspectul pe care îl are obiectul respectiv (eprubetă, bilă, lamă). Evidențierea reacției antigen — anticorp se face fie cu ajutorul unui anticorp marcat cu izotopi radioactivi (generic, procedee de *radioimunoanaliză — RIA),* cu diferite enzime *(reacții imunoenzimatice — RIE)* sau fluorocromi *(fluoroimunoanaliza — FIA)* în așa-numita „fază solidă“, fie prin decelarea directă a interacțiunii antigen-anticorp pe baza, în general, a unor simple fenomene fizice (condensarea vaporilor de apă — imunoanaliză în strat subțire —, absorbția unor particule — mici bile de polimeri — sau modificări de culoare, în cazul suporturilor constituite din metale siliconate), dar și prin fenomene specifice activității antigenelor virale, de felul hemadsorbției.

Procedee RIA, RIE sau FIA se pot desfășura și în „fază lichidă“ ; pentru RIA se utilizează separarea complexelor formate de reactantul rămas liber prin precipitare cu antiglobuline sau cu proteina A stafilococică ; unele procedee RIE sau FIA în fază lichidă nu necesită separări, bazîndu-se pe modificări ale activității enzimatice datorită anticorpilor (RIE în fază omogenă) și respectiv pe modificări de polarizare a emisiei fluorescente sau fenomene de stingere a ei (FIA).

În procedeele în fază solidă utilizate de laboratoarele de diagnostic (RIA, RIE, FIA), identificarea antigenului viral se face după fixarea sa pe suport fie prin adsorbție directă din materialul care se examinează, fie prin „capturarea“ sa prin intermediul unui anticorp care a fost fixat în prealabil pe acest suport ; prezența antigenului este atestată la sfîrșitul reacției prin radioactivitatea rămasă pe suport, prin modificarea culorii unui substrat adecvat de către enzima reținută sau prin fluorescența emisă cînd suportul este examinat în ultraviolet.

RIA are o mare sensibilitate, dar prezintă cîteva inconveniente (radioactivitate, eficacitate limitată în timp a reactantului, necesită aparatură specială) ca și FIA în fază solidă (aparatură costisitoare, mai ales varianta de stabilire a reducerii în timp — TR-FIA), care are o sensibilitate cel puțin egală. Astfel, pentru laboratoarele de rutină procedeele RIE se dovedesc cele mai indicate, cu atît mai mult cu cît sensibilitatea lor este de același ordin, iar accesibilitatea foarte largă ; aprecierea rezultatelor nu cere decît un spectrofotometru obișnuit sau, în caz de nevoie, se face chiar cu ochiul liber fără o scădere substanțială a performanțelor sale.

Alte procedee din categoria celor ce folosesc suporturi solide se bazează pe antrenarea lor în cursul reacției antigen — anticorp realizînd reacții de aglutinare pe suport *(hemaglutinare pasivă — HAP —, latex-aglutinare — LA* — sau *coaglutinare — COA* — în funcție de suportul corespunzător — hematii, latex de polistiren și respectiv stafilococ Cowan I cu proteină A).

Reacțiile de aglutinare pe suport au o sensibilitate ridicată, uneori apreciată ca apropiată de cea înregistrată de RIA sau RIE, fiind însă de o mare accesibilitate.

Antigenele virale aflate în soluție sînt precipitate în unele condiții de către anticorpii corespunzători, de obicei vizualizarea fenomenului nefiind posibilă însă nici în mediu lichid și nici pe suport ; desfășurarea reacției antigen — anticorp într-un gel de agar sau agaroză se exprimă prin apariția unor benzi de precipitare caracteristice. Dintre variantele demonstrate, *dubla difuzie (DD)* după Ouchterlony, recomandată pînă nu de mult în cazul unor infecții precum variola sau hepatita virală B, nu se mai folosește astăzi decît rareori, dat fiind redusa ei sensibilitate ; în schimb, se apelează frecvent, în diagnosticul unor infecții, la dubla difuzie în gel sub influența unui cîmp electric, respectiv la ceea ce se cunoaște sub numele de *contraimunoelectroforeză (CIEF)*. Acest procedeu, cu o sensibilitate redusă dar superioară aceleia pe care o are DD, este încă acceptat datorită rapidității obținerii rezultatului, întrucît migrarea antigenului și a anticorpului este grăbită de acțiunea cîmpului electric și se face pe o singură direcție. Tehnica Laurrell s-a folosit uneori, mai ales în scopul cuantificării antigenului, ca și imunodifuzia radială de tip Mancini utilă pentru determinarea antigenului viral din preparate de diagnostic sau unele destinate imunizării.

Identificarea antigenelor virale aflate în materialele recoltate de la bolnav se poate realiza uneori și prin procedee imunologice curent utilizate în laboratoarele de virusologie : *reacția de fixare a complementului (RFC), reacția de hemaglutinare* și cea *de hemaglutinoinhibare (HA și HAI)* sau cea *de neutralizare (RN)*. Aceste reacții antigen — anticorp se evidențiază în cazul HAI și RN prin blocarea unei activități proprii antigenului viral, respectiv : hemaglutinarea și infectivitatea. În privința activității hemaglutinante prezente în produsul patologic (de exemplu, spălătura nazofaringiană), ea însăși poate sugera eventualul diagnostic.

HAI, RFC și RN au o sensibilitate redusă pentru identificarea antigenului viral, mai ales că virusul sau antigenele sale se află de obicei într-o cantitate mică la nivelul probei ce provine de la bolnav și această prezență trebuie verificată în prealabil prin hemaglutinare sau inocularea unor sisteme biologice sensibile ; rezultatele sînt deci întîrziate, mai ales dacă antigenul viral trebuie să ajungă la anumite concentrații care să satisfacă nevoile procedeului respectiv. Eventual, efectuarea RFC are mai multe șanse de succes pentru detectarea și identificarea simultană.

Toate procedeele menționate au posibilități mărite de reușită dacă se folosesc cu materiale recoltate, la intervale potrivite, de la sistemele biologice inoculate cu probele ce provin de la bolnav ; uneori, această inoculare duce la modificări caracteristice unor infecții anume, dar în alte situații aceste modificări nu apar. Cu toate acestea, efectuarea unor reacții de diagnostic poate pune în evidență virusul sau antigenele sale ; mai mult decît atît, această evidențiere poate fi deosebit de precoce în relație cu modificările caracteristice. Astfel, în culturi de celule inoculate cu diferite virusuri, antigenele proprii se evidențiază cu mult înainte ca modificările celulelor să fie înregistrate, dacă acestea se examinează prin imunofluorescență.

c) În arsenalul laboratoarelor de virusologie au intrat recent unele procedee care nu mai apelează la reacții de tip antigen — anticorp, ci la recunoașterea altor componente virale, astfel :

— procedeele care se adresează genomului viral, ARN sau ADN, folosind clivarea acizilor nucleici și recunoașterea fragmentelor caracteristic localizate după electroforeza în gel de poliacrilamidă (PAGE) (rotavirusuri au putut fi astfel recunoscute în fecalele provenind de la bolnavi, chiar dacă virusul nu a fost izolat) (Herring, 1982 ; Kasempimolporn, 1988) ;

— procedeele de hibridizare a acizilor nucleici virali prezenți în produse patologice care, după clivarea și depunerea lor pe membrana de nitroceluloză cu autoradiografierea ulterioară, stabilesc prezența și identifică virusul în cauză. Hibridizarea ADN se realizează și *in situ*, permițînd detecția și localizarea fragmentelor virale specifice la nivelul țesuturilor și chiar al celulelor.

d) Izolarea și identificarea virusurilor constituie și astăzi criteriul de bază pentru stabilirea etiologiei virale a unei infecții. Costul, durata și volumul de muncă necesare izolării virusurilor impun o selecționare a cazurilor în care să se încerce izolarea virusului, ca și colectarea corectă a probelor celor mai indicate în acest scop, cu transport și prelucrare adecvată la laborator. În afara situațiilor care impun un diagnostic etiologic (pentru asistența bolnavului sau a colectivității, cu preparate și măsuri corespunzătoare), indicații speciale pentru izolarea virusului apar în situații precum : apariția unei noi epidemii cînd trebuie stabilit virusul sau varianta sa în circulație (de exemplu, în evoluția infecției gripale) ; în afecțiuni cărora li s-a stabilit un diagnostic prezumtiv prin unul din procedeele descrise și cînd se impune confirmarea (de exemplu, în cazul detectării mai multor antigene virale prin imunofluorescență în celulele prezente în anumite probe recoltate de la bolnav) ; atunci cînd rezultatele investigațiilor serologice nu permit a se face precizarea infecției în cauză și mai ales atunci cînd aceleași manifestări clinice pot fi cauzate de mai multe virusuri (Jawetz, 1987). Reamintim că nici chiar izolarea unui virus nu înseamnă în mod obligator implicarea sa în boala investigată ; astăzi au fost stabilite criterii care depășesc cadrul limitat al postulatelor lui Koch.

Inocularea se face cu probe, dintre care unele pot fi considerate sterile (LCR, sînge — plasmă sau ser —, eventual urină), în timp ce altele impun tratarea corespunzătoare pentru clarificare și îndepărtarea bacteriilor și fungilor (urină, diferite secreții recoltate prin aspirare, spălătură sau cu tamponul, ca și suspensiile preparate din fecale și fragmente de țesuturi, deși uneori acestea din urmă se obțin prin manopere aseptice).

Sistemele biologice sensibile (SBS) sînt reprezentate de animale (de obicei animale mici de laborator, dar și animale capturate din natură, cum sînt maimuțele), ouă embrionate și culturi de celule (în această categorie incluzîndu-se și culturile în fragmente de organe sau țesuturi, necesare în cazul unor virusuri mai pretențioase) ; primele sisteme menționate au fost utilizate cu precădere în perioada începuturilor virusologiei, dar perfecționările aduse continuu culturilor de celule au făcut ca astăzi inocularea la animale sau pe ouă embrionate pentru izolarea virusurilor să aibă loc numai în anumite cazuri, și mai frecvent pentru identificare sau pentru obținerea unor preparate de diagnostic. Într-adevăr, astăzi aproape toate virusurile umane cunoscute pot fi izolate pe culturi de celule realizate în diferite moduri, cultivarea în monostrat reprezentînd procedeul folosit în marea majoritate a sistemelor virale implicate în patologia umană, cultivarea celulelor în suspensie sau a fragmentelor de țesuturi fiind rezervată unor categorii speciale de virusuri. De asemenea, pentru marea majoritate a virusurilor umane se face identificarea izolatelor printr-o reacție foarte sensibilă și de mare specificitate — reacția de neutralizare —, ca și prin numeroase procedee din categoria celor servind și pentru identificarea virusurilor direct din produsele patologice (ME, IME, IF, IPO, RIA, RIE, HAP, HAI, LA, CIEF etc.).

Prezența virusului în produsul inoculat se traduce prin modificări uneori caracteristice la nivelul țesuturilor și prin simptomatologie clinică cu evoluție diversă, conducînd uneori la moartea animalelor și respectiv a embrionilor ; adesea, infecția nu se manifestă imediat după inoculare și se fac treceri repetate în aceleași sisteme biologice pînă cînd multiplicarea și acumularea progresivă a unei cantități mai mari de virus conduce la declanșarea manifestărilor caracteristice. Uneori, infecția virală evoluează inaparent și prezența virusului este atestată numai de modificări imunologice specifice (la animale), de apariția unor activități proprii virusului (hemaglutinare în ouă embrionate sau culturi de celule) sau prin rezistența față de o altă infecție virală (interferență în cazul culturilor de celule).

Identificarea virusurilor izolate se efectuează prin procedee morfologice (ME sau colorare simplă pentru particule virale și mai ales pentru incluzii), prin stabilirea unor proprietăți (dimensiuni, rezistență la agenți fizici și chimici), prin stabilirea caracterelor antigenice (identificarea reactivității imunologice specifice prin reacțiile amintite), ca și determinarea secvențelor genomice caracteristice.

15.3. METODOLOGII ŞI PROCEDEE DE DIAGNOSTIC

15.3.1. IZOLAREA ŞI IDENTIFICAREA VIRUSURILOR

Cum am mai menţionat, izolarea şi identificarea virusurilor constituie şi astăzi un criteriu de bază pentru confirmarea unei infecţii virale.

Izolarea virusului se realizează prin inocularea materialului recoltat (de la bolnav, rezervoare animale de virus, vectori, mediu exterior etc.) în sisteme biologice sensibile, încît în celulele acestora agentul viral să se replice şi să poată fi recunoscut pe baza proprietăţilor sale ; identificarea sa foloseşte criterii morfologice, fizico-chimice, antigenice, de activitate şi patogenitate.

15.3.1.1. *Izolarea prin inocularea animalelor de laborator*

În mod obişnuit, pentru izolare se inoculează animale mici precum iepurii, cobaii, hamsterii, şobolanii şi mai ales şoarecii albi ; în cazuri speciale se folosesc animale mari, dintre care maimuţa a jucat un rol important pentru recunoaşterea unor agenţi virali (de exemplu, în febra galbenă, poliomielită, hepatita virală, boala de Marburg), dar procedeul nu este accesibil în diagnosticul curent (aspecte economice, de aprovizionare şi de întreţinere etc.).

Important este faptul că există diferenţe de sensibilitate faţă de acelaşi virus nu numai în funcţie de specia animală, ci şi dependente de rasă ; sensibilitatea animalelor de laborator este în mod evident corelată cu vîrsta lor (de exemplu, inocularea arbovirusurilor trebuie să se adreseze şoarecilor în primele zile după naştere, altfel susceptibilitatea lor scade nu numai la inocularea intraperitoneală sau subcutanată, ci chiar la cea intracerebrală).

Animalele se inoculează pe căi diferite : subcutanat, intravenos, scarificare cutanată sau corneană, intranazal (i.n.), intraperitoneal (i.p.) şi foarte frecvent intracerebral (i.c.) ; alegerea căii de inoculare este de asemenea în funcţie de virusul ce se presupune a fi prezent în materialul investigat (de exemplu, şoarecele nou-născut este inoculat intracerebral pentru izolarea unui arbovirus, dar subcutanat pentru aceea a virusului Coxsackie).

Unele din căile de inoculare reproduc modalităţile de infectare a omului (de exemplu, inocularea prin aerosoli sau numai instilaţie nazală în cazul virusurilor gripale), dar altele pot fi considerate complet artificiale ; dacă în primul caz infecţia la animal poate avea similitudini cu simptomatologia la om (de exemplu, inocularea maimuţelor prin aerosolizarea virusului variolic), în celălalt manifestările la animal sînt mai puţin caracteristice (de exemplu, paralizii de diferite tipuri ca urmare a inoculării intracerebrale cu numeroase virusuri).

În mod obişnuit, după inocularea animalului există o perioadă de incubaţie caracteristică pentru virus, specia animală şi calea de inoculare, după care apare o simptomatologie mai mult sau mai puţin diferenţiată şi animalele de obicei mor, deşi uneori se pot vindeca ; infecţia virală poate evolua uneori inaparent, timp în care la animalul inoculat se produc modificări ale sistemului imunitar, modificări ce se pot investiga şi astfel să ateste identitatea virusului (tabelul 15—V).

TABELUL 15-V

Izolarea unor virusuri prin inoculare la animale

Virusuri	Specia animală	Calea de inoculare	Efecte
Arbo	şoarece + şoarece sugar +++	i.c., i.p.	encefalită, moarte
Virusul febrei galbene	maimuţă +++	i.p.	necroză hepatică
Virusul febrei de căpuşă de Colorado	hamster	i.p.	encefalită
Herpetic	iepure	intraconjunctival	keratoconjunctivită, encefalită
	şoarece sugar	i.p., i.c.	encefalită, necroză hepatică
	şoarece adult	i.c.	convulsii, moarte
Rabic	şoarece	i.c.	encefalită şi moarte, corpusculi Babeş-Negri
Citomegalic	şoarece	i.c.	encefalită şi coroidită, moarte
	cobai	i.p.	pneumonie, infiltrat hepatic, moarte
Vaccinal	iepure	i.d.	noduli, incluzii citoplasmatice
Gripal	şoarece	i.n.	pneumonie
	dihor	i.n.	pneumonie
Urlian	maimuţă	intraparotidian	parotidită
Coxackie	şoarece sugar	s.c., i.p., i.c.	paralizii cu miozită, unele encefalite ; pancreatită ; paralizii (rar) (în funcţie de tip A sau B)

+, +++ = sensibilitatea animalului.

În organismul animalului inoculat virusul se evidenţiază în sînge la nivelul ţesuturilor şi organelor, de la care se fac treceri (la animale, pe ouă embrionate sau pe culturi de celule) pentru control şi identificare (de exemplu, prin procedee de neutralizare), pentru obţinere de material viral (antigenic în primul rînd) necesar altor procedee de identificare imunologică, ca şi pentru adaptarea şi păstrarea virusului izolat.

În cazul în care animalul inoculat nu manifestă vreun semn de îmbolnăvire, se fac mai multe treceri la alte animale, care să asigure o replicare suficientă a virusului pentru a permite diferite alte procedee de identificare (aşa-numitele pasaje „oarbe").

Susceptibilitatea slabă sau chiar absentă faţă de anumite virusuri poate fi modificată prin tratarea adecvată a animalelor din categoria respectivă cu ciclofosfamidă sau corticoizi, ca şi prin iradieri (X sau gamma) (Cajal şi colab., 1962).

Evidențierea virusului sau a antigenelor sale este posibilă chiar înainte de apariția simptomelor de boală la animale, și mai ales înainte de moartea lor, cu ajutorul unor procedee de mare sensibilitate [de exemplu, identificarea precoce — prin hemaglutinare pasivă — a unor arbovirusuri în sîngele șoarecilor inoculați (Gaidamovici, 1978)] dar, cel mai adesea, este realizată numai după moartea sau sacrificarea animalelor bolnave ; criteriile sînt multiple :

— leziuni macro- sau microscopice la nivelul unor țesuturi și organe, în această categorie intrînd și prezența incluziilor (de exemplu cele din infecția rabică, detectarea efectuîndu-se prin colorări obișnuite sau prin IF) ; aspectul histopatologic este rareori caracteristic ;

— reproducerea leziunilor și manifestărilor patognomonice prin inoculare de sînge sau probe de organe recoltate de la aceste animale în alte sisteme biologice sensibile ;

— identificarea virusului, a antigenelor sau a unor componente structurale cu ajutorul procedeelor indicate pentru aceasta (ME, reacții imunologice, hibridizarea fragmentelor de genom) și determinarea altor proprietăți.

15.3.1.2. *Izolarea prin inocularea ouălor embrionate*

Numeroase virusuri se replică în celule aparținînd uneia din cele trei foițe embrionare ale oului embrionat ; virusurile și antigenele lor se regăsesc în lichidele embrionare, în celulele membranelor sau chiar în țesuturile embrionului.

Virusurile se pot cultiva în oul embrionat de obicei după adaptare prin treceri repetate și astfel se obțin diferite preparate virale de diagnostic sau pentru vaccinare ; la inocularea directă a probelor recoltate de la bolnav multe virusuri nu se replică și trebuie făcute treceri oarbe.

În mod obișnuit se folosesc ouăle embrionate de găină, dar și cele provenind de la alte păsări sînt susceptibile (de exemplu, cele de prepeliță).

Inocularea se efectuează pe căi diferite în funcție de susceptibilitatea celulelor pentru virusul în cauză : intraamniotic sau intraalantoidian, pe membrana corioalantoidiană (MCA), intravitelin sau chiar direct în embrion (de exemplu, intracerebral) ; indiferent de calea pe care se inoculează proba, virusul poate fi regăsit și la alte niveluri (de exemplu, după inocularea intraamniotică virusul gripal este prezent și în cavitatea alantoidiană) (tabelul 15—VI).

TABELUL 15-VI

Izolarea unor virusuri prin inoculare în ou embrionat

Virusuri	Calea de inoculare
Poxvirusuri	MCA
Virus herpetic	MCA
Virusuri gripale	cavitate alantoidiană sau amniotică
Virus urlian	cavitate amniotică, sac vitelin

Ca o consecință a căii de inoculare recomandate, ca și a intervalului la care se face recoltarea pentru control, vîrsta embrionului diferă.

Prezența virusului cultivat și acumulat într-o cantitate satisfăcătoare se recunoaște prin : reducerea mișcărilor pînă la imobilizarea embrionului ca semn al morții sale ; la nivelul membranelor — hemoragii, îngroșarea și opacifierea lor ; apariția leziunilor caracteristice — nodulii (*pock*-urile) — pe MCA ; de asemenea, lichidele embrionare capătă activități proprii virusului (hemaglutinare).

Pentru stabilirea prezenței virusului și identificarea sa se examinează prin procedee convenabile lichidele embrionare ca atare, precum și membranele sau fragmente de embrion ; în lichidele embrionare se găsesc și celule în interiorul cărora poate fi decelat antigenul viral.

Important pentru folosirea ouălor embrionate :

— Ouăle embrionate prezintă diferențe de sensibilitate în funcție de sursă, dar și la aceeași proveniență există variații de anotimp.

— Posibilitatea interferenței în urma inoculării impune ca proba să fie folosită și în diluții.

— Identificarea virusurilor care dau leziunile proliferative caracteristice (*pock*-uri) ține seama de : perioada de incubație în apariția lor, densitatea, dimensiunile, profilul (turtit sau bombat), aspectul marginilor, hemoragii sau necroze ; în cazul poxvirusurilor, o indicație importantă oferă stabilirea temperaturii la care apar leziunile.

Ouăle embrionate au permis o variantă avantajoasă pentru cultivarea și diagnosticul infecțiilor virale : fragmente de coajă cu porțiunea respectivă de MCA se mențin într-un mediu adecvat, similar cu culturile de țesuturi sau de fragmente de organe.

15.3.1.3. *Izolarea prin inoculare în culturi de celule*

Culturile de celule reprezintă astăzi instrumentul principal al laboratorului pentru izolarea și identificarea virusurilor ; de la descoperirea lui Enders, Wheller și Robbins (1948) privind posibilitatea replicării virusului poliomielitic în culturi de celule neuronale și pînă astăzi, tehnica culturilor de celule s-a perfecționat continuu, folosind nu numai aspectelor de cercetare sau de producție, ci și celor practice ale diagnosticului etiologic. Culturile de celule pot interveni în cursul acestuia în mod diferențiat :

— Majoritatea virusurilor se pot izola în diferite variante actuale ale culturilor de celule, unele cu multă ușurință, pentru altele trebuind să se apeleze la prelucrări speciale (tripsinizare, cocultivare, explante etc.).

— Chiar și în cazul virusurilor cu izolare primară dificilă sau chiar (încă) imposibilă, tulpinile standard, antrenate pe culturi de celule, folosesc diagnosticului serologic în sistemul viral respectiv. Astfel, în prezent, izolarea virusurilor pe animale în diagnosticul de rutină se face numai în cîteva cazuri, de altfel ca și cea pe ouă embrionate (de exemplu, virusul rabic și arbovirusurile, respectiv poxvirusurile, virusul urlian și eventual cel gripal) ; aprovizionarea și manipularea acestor sisteme biologice se dovedește dificilă, în timp ce pentru culturile de celule s-au creat cele mai variate posibilități de furnizare în teren (transport, păstrare, utilizare) de la laboratoarele centrale care pot standardiza și controla eficiența lor.

Pentru diagnosticul curent se folosesc atît culturi primare cît și anumite linii, fiecare din ele prezentînd indicații precise, cu avantaje și dezavantaje proprii. La nivelul laboratoarelor de diagnostic din prima categorie se folosesc mai ales culturile de celule de rinichi de maimuță, ca și cele de embrion uman, dar mai există numeroase alte surse care se explorează. În mod deosebit însă, pentru laboratoarele de diagnostic sînt indicate liniile celulare stabile, cu multiple avantaje, dintre care se impune acela că, în cazul unor virusuri, evidențiază ECP care nu poate fi decelat pe nici un tip de cultură primară (de exemplu, virusul rubeolic pe celule Vero sau pe cele ale liniei de epiteliu ocular Copenhaga).

În diagnosticul infecțiilor virale sînt utilizate linii de origine tumorală (HeLa, KB, Detroit-6, HEp-2), linii provenite din culturi primare de organe embrionare sau adulte de la animale sau om (BHK, Vero, BSC-1, PK etc.) (tabelul 15-VII), ca și linii diploide. Investigarea spectrului de sensibilitate a diferitelor culturi de celule a demonstrat posibilitățile liniilor celulare (tabelul 15-VIII).

TABELUL 15-VII

Proveniența unor linii folosite în laboratorul de virusologie

Denumirea liniei	Specia de la care provine	Proveniența
HeLa	om	carcinom epitelial
Fl		amnios
KB		carcinom epidermoid
HEp-2		carcinom epidermoid
RD		rhabdosarcom
MRC-5		celule pulmonare de embrion
L-132		plămîn de embrion
LLC-MK-2	maimuță	rinichi de *M. mulatta*
BS-C-1		rinichi de *C. aethiops*
Vero		rinichi de *C. aethiops*
L	șoarece	țesut subcutanat
BHK-21 (și clona 13)	hamster auriu sirian	rinichi
PK	porc	rinichi
MA-188	cal	testicul

TABELUL 15-VIII

Culturi de celule utilizate cel mai frecvent în izolarea și menținerea unor virusuri implicate în patologia umană (după Mayr și colab., 1979 și B. W. J. Mahby, 1985)

Virusuri	Culturi de celule primare sau diploide	Linii celulare
Adeno	RM*; embrion de om (r, pi, pl)**; RP (în general celule epiteliale de la specii animale apropiate celor investigate)	HeLa, HEp-2, KB, MRC-5
Herpetic	RM; embrion de om; amnios de om; rinichi de cîine; rinichi de iepure; fibroblaste din embrion de găină	HeLa, HEp-2, BHK-21 și cl-13
Citomegalic	RM *(Cercopithec)*; embrion de om (pl); rinichi de iepure	MA-188
Varicella-zoster	RM; embrion de om (r, pi)	HeLa
Varicelic	RM; embrion de om; fibroblaste din embrion de găină	HeLa, KB
Vaccinia	RM; embrion de om (r, pi); fibroblaste din embrion de găină	HeLa
ECHO	RM; rinichi de om	HeLa, FI
Coxsackie, A, B	RM; amnios de om	HeLa, KB
Polio	RM; rinichi de om; amnios de om; rinichi de iepure	HeLa
Rhino	RM; rinichi de om	HeLa, KB, HEp-2
REO 1, 2, 3	RM *(Rhesus)*; embrion de om (pl); amnios de om	HeLa, L-132, L-murin
Rubeolic	RM; rinichi de om; amnios de om	
Corona	embrion de om (r, pi, pl)	L-132
Arbo (diferite în funcție de tipul de virus)	RM *(Rhesus)*; fibroblaste din embrion de găină	HeLa, Vero, LLCMK-2, BHK-21, PK-15; AP-61 și alte linii de celule de țînțari
Gripal A	RM *(Rhesus)*; embrion de om (r, pl); fibroblaste din embrion de găină	HeLa
Gripal B	RM *(Rhesus)*; fibroblaste din embrion de găină	
Paragripale 1, 2, 3; urlian; rujeolic	RM *(Rhesus, Cercopithec)*; fibroblaste din embrion de găină	HeLa
Respirator sincițial	embrion de om	HEp-2, HeLa, BS-C-1, Vero, MRC-5

* rinichi de maimuță *(Rhesus* sau *Cercopithec)*.

** rinichi, piele, plămîn.

În mod obişnuit pentru diagnostic, celulele se cultivă în monostrat în eprubete, pe sticla acestora sau pe lamele (de exemplu, pentru identificarea ulterioară a izolatului prin IF sau IPO) ; uneori, cultura se face în flacoane speciale. În vederea efectuării unor anumite procedee de identificare, celulele se cultivă pe materiale plastice (polimeri) — în plăci cu godeuri sau cutii rotunde cu diametrul de 6 cm. Mai puţin cu ocazia izolării, de obicei pentru obţinerea unor preparate virale necesare unor etape ulterioare, se folosesc culturi de celule în suspensie ; izolarea virusurilor s-a dovedit facilitată de rotarea tuburilor în culturi celulare inoculate.

Materialul care se inoculează în culturi de celule trebuie recoltat şi transportat în condiţii care să menţină virusul, împiedicînd în acelaşi timp dezvoltarea altor microorgarisme care ar deteriora cultura de celule. În legătură cu menţinerea activităţii virusului experienţa a dovedit că inocularea chiar la sursă (de exemplu, la patul bolnavului) oferă posibilităţi deosebite de izolare. Transportul materialelor se face rapid, la rece (chiar la temperatura de congelare, în mod deosebit la —70°C) sau într-un mediu de transport căruia i se adaugă antibiotice. Înainte de inoculare, materialul suferă unele prelucrări (clarificare prin centrifugare, mai ales după suspensionarea probelor solide ; concentrare ; tratare cu enzime sau alţi reactivi etc.).

Culturile de celule se pregătesc şi ele pentru a primi inoculul ; important este ca, după îndepărtarea mediului de creştere pentru celule, monostratul să fie spălat pentru a se îndepărta urmele de ser care pot conţine factori inhibitori ai replicării virale sau chiar numai inhibitori ai unei activităţi prin care virusul ar fi recunoscut ulterior (de exemplu, virusul urlian cultivat pe celule : în anumite condiţii, lichidul de cultură nu are activitate hemaglutinantă).

În general, pentru izolarea şi identificarea unor virusuri întîlnite în patologia umană se recomandă ca inocularea probelor recoltate să se facă pe cel puţin 3 tipuri de celule (P. Morgan-Capner şi J. R. Pattison, 1985) :

— celule de tip epitelial, în cultură primară sau secundară, provenind de la embrion de om sau rinichi de maimuţă ;

— o linie semicontinuă sau continuă de tip fibroblastic uman (plămîn de embrion de om — WI-38, MRC-5 sau EU — celule obţinute în Institutul de Virusologie) ;

— o linie continuă epitelială (HEp-2 sau HeLa). Incubarea culturilor de celule inoculate se face la o temperatură convenabilă replicării fiecărui virus în parte (de exemplu, în mod curent incubare la 37°C, dar pentru virusurile gripale temperaturile sînt mai scăzute) ; selecţionarea temperaturii pentru incubarea celulelor inoculate se impune mai ales atunci cînd este nevoie să se diferenţieze anumite virusuri (de exemplu, diferenţierea virusului variolic de alte poxvirusuri).

Prezenţa virusului în culturile de celule inoculate se semnalează prin ECP, care se manifestă diferit, de la alterări minime decelabile numai microscopic pînă la unele vizibile cu ochiul liber ; cel mai adesea ECP constă în rotunjirea celulelor, picnoză, cădere de pe suport, lăsînd în monostrat goluri de forme și dimensiuni uneori caracteristice, ajungînd adesea la desprinderea completă a monostratului. Alături de această modalitate, cel mai frecvent întîlnită, leziunile celulare pot apărea cu degenerări granulare sau vacuolare, formare de celule gigante sau sinciții, proliferări celulare pînă la apariția unor formațiuni nodulare ; în cazul unor virusuri se formează incluzii intracelulare, la nivel de nucleu sau de citoplasmă.

Uneori, modificările celulare sînt atît de reduse încît pot să scape și examenului microscopic ; ECP lipsește fie pentru că virusurile nu au acțiune citopatogenă, fie, mai probabil, pentru că nu se cunoaște încă tipul de celule în care asemenea efect să apară. Totuși, ECP poate să fie produs de astfel de virusuri după ce au fost antrenate prin treceri oarbe pe culturi celulare (de exemplu, virus gripal sau virus rabic), în felul acesta putînd fi folosit pentru identificarea ulterioară a virusului prin reacția de neutralizare.

Atunci cînd inocularea materialului se face direct pe monostrat în cutii, acoperit apoi cu un strat de gel de agar sau agaroză, leziunile celulare se evidențiază prin aspectul așa-numitelor plaje, ale căror caracteristici (dimensiuni, formă, aspectul marginilor) nu numai că sugerează identitatea virusului în cauză, ci adesea permit aprecierea unor proprietăți pe care acesta le are (de exemplu, virulența).

Atunci cînd nu determină un efect citopatic, prezența virusurilor poate fi cercetată cu ajutorul unor teste, precum cel de culoare (util mai ales pentru examene serologice de neutralizare), hemadsorbția (în care caz specia hematiilor poate sugera tipul de virus prezent) sau prin cel de interferență (de exemplu, blocarea ECP provocat de virusul ECHO 11, de către virusul rubeolic replicat în prealabil în culturi de celule de origine umană).

În cazul unor virusuri sînt necesare prelucrări speciale pentru a mări susceptibilitatea culturilor de celule. În acest scop se folosește frecvent cultivarea lor în prezența tripsinei (de exemplu, mai ales pentru izolarea rotavirusurilor sau a reovirusurilor) ; și pentru DEAE-dextran s-a indicat o acțiune similară în cazul virusului varicella-zoster (Keiko, 1981). În cazul infecțiilor lente, pentru izolarea agenților virali se practică o cocultivare, iar pentru HIV, limfocitele se activează în prealabil cu ajutorul serului antiinterferon.

În timp ce unele virusuri cultivă și se manifestă rapid în culturi de celule, altele necesită o incubare prelungită și treceri succesive prin mai multe rînduri de substrat celular (pasaje oarbe) pînă ce prezența lor se exprimă.

Celulele și lichidul nutritiv în care au fost menținute servesc în continuare pentru identificarea agentului viral prezent.

În concluzie, culturile de celule au un rol primordial în diagnosticul de laborator, chiar dacă unele virusuri nu pot fi încă cultivate și izolate, iar unele se dezvoltă foarte greu ; ultimele trei decenii de cercetare în acest domeniu dovedesc numai limita noastră actuală și certitudinea progreselor viitoare.

15.3.1.4. *Identificarea virusurilor izolate*

Spre deosebire de recunoaşterea virusului sau a antigenelor sale direct în materialele recoltate de la bolnav, inocularea acestora în SBS se soldează cu obţinerea unei cantităţi de virus (implicit şi de alte componente antigenice), consecutiv replicării sale la nivelul celulelor acestor sisteme ; suspensia de virus obţinută ca atare (de exemplu, lichide embrionare provenind din oul embrionat inoculat, lichidul de cultură celulară în care virusul s-a replicat sau sîngele animalului recoltat în perioade de viremie consecutiv inoculării) sau virusul prezent în organele şi ţesuturile recoltate de la ouă sau animale ca şi în celulele culturilor reprezintă izolatul viral. În prima situaţie, identificarea virusului se poate efectua direct asupra lichidelor (eventual după clarificare şi concentrare) ; din celule, ţesuturi şi organe el trebuie extras şi bineînţeles purificat şi concentrat spre a putea fi identificat.

Identificarea izolatului viral începe încă din perioada desfăşurării acestui proces ; manifestările constatate la SBS pot uneori indica virusul în cauză, pe baza unor caractere de patogenitate astfel exprimate ; stabilirea caracterelor de patogenitate se continuă apoi cu suspensiile de virus, urmărindu-se spectrul de patogenitate asupra diferitelor sisteme biologice sensibile.

Criteriile de identificare a virusurilor izolate pot fi folosite separat sau asociat :

— La nivelul sistemului biologic inoculat în culturi de celule, replicarea virusului poate fi controlată prin : dezvoltarea ECP caracteristic, apariţia unor activităţi ce ţin de proteinele codificate de către virus (hemaglutinină) prin probe de hemaglutinare sau de hemadsorbţie, interferenţa produsă de un virus fără activitate citopatogenă faţă de unul care determină ECP ; moartea embrionilor sau apariţia leziunilor pe MCA ; simptome diferite de îmbolnăvire (dispnee, tremor, paralizii etc.) şi moarte la animale.

— La nivelul celulelor (frotiuri prin etalare sau prin impresiune) antigenele virale pot fi recunoscute prin procedee imunologice, IF şi IPO în special ; procedeele imunologice servesc de asemenea la recunoaşterea antigenelor virale din lichidele recoltate sau din suspensiile de celule, ţesuturi sau organe, atît prin procedee clasice (RFC, HA-HAI, RN, precipitare în gel, HAP etc.), cît mai ales prin cele mai moderne de mare sensibilitate (RIA, RIE etc.).

— Un criteriu important, dar mai puţin accesibil în activitatea de rutină, constă în stabilirea morfologiei virusului prin ME, pe baza căreia unele virusuri sînt rapid şi definitiv identificate (de exemplu, virusul variolic), în timp ce unele necesită prelucrări suplimentare spre a se stabili tipul lor (de exemplu, virusuri herpetice, rotavirusuri etc.) — printre care IME.

— Stabilirea dimensiunilor se realizează şi prin ME dar, în lipsa dotării adecvate, filtrarea prin materiale cu porozităţi cunoscute (tabelul 15-IX) precizează mărimea particulelor virale.

— Importantă pentru identificare şi diferenţiere este stabilirea comportării virusului şi a unora din activităţile sale sub acţiunea unor agenţi fizici şi chimici : căldură şi frig, pH (de exemplu, enterovirusurile sînt

TABELUL 15-IX

Procedee de stabilire a dimensiunilor virusurilor

Procedeul folosit	Criterii de apreciere
Procedee de filtrare – filtre tip Millipore – filtre de colodiu	– în funcție de diametrul mediu al porilor membranelor care rețin virusul, diametrul virusului se obține prin multiplicarea cu factor 0,64
Procedee de ultracentrifugare	– mărimea particulei în relație cu rata de sedimentare
Procedee de examinare ME	– comparare cu suspensii cunoscute de particule diferite (bacterii, latex, aur coloidal etc.)
Procedee prin radiații ionizante	– mărimea particulei sau a activității corespunzătoare proporțională cu energia necesară pentru inactivare

acido-rezistente), stabilizarea preferențială de către diferite săruri la acțiunea căldurii ($MgCl_2$, 1M, stabilizează picorna- și reovirusurile, aceeași concentrație de $MgSo_4$ — ortho- și paramyxovirusurile iar cea de Na_2SO_4 stabilizează virusurile herpetice), inactivarea sub acțiunea eterului (de fapt, diferențierea virusurilor cu înveliș de cele fără) (tabelul 15-X), cloroformului sau a unor detergenți (solubilizarea lipidelor din membrană cu eliberarea proteinelor în cazul detergenților neionici, precum Nonidet P40 sau Triton X-100, sau fragmentarea proteinelor capsidei în polipeptide separate, cum realizează sodiumdodecilsulfatul). Diferite radiații au acțiuni caracteristice : în general afectează mai repede infectivitatea și abia apoi alte proprietăți, precum antigenitatea, după cum diferit se manifestă și inactivarea fotodinamică.

TABELUL 15-X

Sensibilitatea virusurilor la acțiunea eterului

Virusuri eter-sensibile	herpes-, ortho- și paramyxo-, rhabdo-, corona-, retro-, arena-, anumite arbo- (toga-, flavi-, bunya-) virusuri*
Virusuri eter-rezistente	parvo-, papova-, adeno-, reovirusuri

* Poxvirusurile se comportă variabil sub acțiunea eterului.

— Identificarea virusului izolat se realizează astăzi și prin procedee de hibridizare, datorită cărora sînt recunoscute fragmente caracteristice genomului diferiților agenți virali.

— În fine, pentru identificarea izolatului, necesitînd însă o purificare prealabilă, se folosește determinarea compoziției chimice în lipide, proteine, acizi nucleici (tip, cantitate, conținut G-C etc.).

15.3.2. DIAGNOSTICUL SEROLOGIC AL INFECȚIILOR VIRALE

În cursul infecțiilor virale, în sîngele bolnavilor apar anticorpi față de diferitele structuri antigenice ale virusului în cauză ; detectarea, identificarea și cuantificarea lor constituie obiectul diagnosticului serologic.

In vitro, în prezența antigenului viral complex — reprezentat de o suspensie de virus preparată din substratul biologic în care a fost inoculat acesta —, ca și în prezența unor componente obținute și purificate din suspensia virală brută, anticorpii realizează reacții antigen — anticorp cu exprimări diverse, datorită cărora au și fost denumiți în mod corespunzător (de exemplu, anticorpi fixatori de complement, anticorpi precipitanți etc.). Această diversitate a manifestărilor reacțiilor antigen — anticorp ține de faptul că răspunsul imun umoral (respectiv anticorpii) are un caracter policlonal, ca și de faptul că anticorpii cu anumite activități fac parte din clase diferite de imunoglobuline (IgM, IgA sau IgG) în funcție de caracterul răspunsului imun (primar sau secundar) și de intervalul de la acțiunea agentului viral (la începutul bolii sau tardiv, în convalescență).

În investigarea serologică a infecțiilor virale, reacția antigen — anticorp este demonstrată fie printr-o manifestare caracteristică (precipitare), mai frecvent prin blocarea consecutivă a unei activități proprii virusului sau antigenelor sale (infectivitate sau hemaglutinare și hemadsorbție), fie — cel mai frecvent în perioada actuală — prin comportarea unor sisteme introduse suplimentar în completarea reacției antigen — anticorp propriu-zise (sistem hemolitic și complement în reacția de fixare a complementului ; suport — particule care se antrenează și realizează o aglutinare — în hemaglutinarea pasivă și alte aglutinări pe suport ; antiglobuline marcate cu izotopi, enzime sau fluorocromi, a căror reținere pe complexele antigen — anticorp poate fi determinată în mod caracteristic) sau prin unele modificări de natură fizică, precum condensarea vaporilor de apă la nivelul complexului antigen — anticorp format pe suprafața unor anumite materiale.

În diferite infecții virale se descrie o anumită succesiune a apariției anticorpilor cu activități diferite, particularitățile trebuind a fi bine cunoscute pentru alegerea procedeelor de investigare, potrivit perioadei de boală și pentru o interpretare corectă a rezultatelor. Astfel, în cele mai multe infecții arbovirale, anticorpii neutralizanți și cei inhibitori ai hemaglutinării apar în cîteva zile de la debutul bolii și pot persista mai mulți ani, în timp ce anticorpii fixatori de complement se detectează mai tîrziu și dispar mult mai repede ; în schimb, în infecția urliană, apar precoce anticorpi fixatori față de antigenul S (cei față de antigenul V se decelează ulterior), în timp ce hemaglutinoinhibarea se înregistrează mai tîrziu.

Posibilitățile moderne de purificare a antigenelor-componente virale, de obținere a unor antigene sau determinanți antigenici prin sinteză, ca și metodologia anticorpilor monoclonali, arată că — pe lîngă caracterul policlonal al răspunsului umoral — intervin diferențe de formare a anticorpilor față de antigene diferite (determinanți antigenici diferiți), care pot fi sau nu timo-dependente și corespund fiecare unei activități anume pe care o posedă virusul. La această situaţie se adaugă diferenţele în clasele de imunoglobuline prin care răspunde organismul infectat, ca şi cele de dinamică a anticorpilor aparţinînd uneia sau alteia dintre imunoglobulinele serice.

În alegerea procedeelor de investigare serologică trebuie să se ţină seama şi de proprietăţile anticorpilor stimulaţi în respectiva infecţie, şi anume specificitatea lor, afinitatea şi aviditatea cu care se leagă de antigenul corespunzător. Anticorpii adresaţi diferitelor activităţi virale demonstrează specificităţi diferite, astfel : reactivitatea încrucişată între arbovirusuri din aceeaşi grupă face diagnosticul dificil în anumite situaţii (de exemplu, cînd există un focar epidemic determinat de un membru al grupului într-un teritoriu unde evoluează endemic alt virus din acelaşi grup sau atunci cînd bolnavul a mai fost infectat cu un virus înrudit) ; anticorpii neutralizanţi pot stabili eventual tipul de virus (specificitate mare), cei fixatori de complement şi mai ales cei hemaglutinoinhibanţi interacţionează cu multiple antigene virale înrudite.

Identificarea anticorpilor faţă de un agent viral nu ne dă certitudinea că infecţia respectivă este prezentă la bolnav şi nici că ea ar fi evoluat destul de recent ; prezenţa anticorpilor decelaţi cu un anumit antigen viral poate fi consecinţa unei stimulări nespecifice, datorită unei infecţii recente cu un virus înrudit, la un fost bolnav sau vaccinat, după cum anticorpii pot proveni din persistenţa îndelungată a lor după o infecţie trecută. De obicei, anticorpii neutralizanţi şi chiar cei hemaglutinoinhibanţi persistă ani şi procedeele corespunzătoare sînt indicate pentru anchetele seroepidemiologice (de exemplu, în stabilirea prevalenţei infecţiilor arbovirale la nivelul unei populaţii reacţia de hemaglutinoinhibare este indicată, dar cea de fixare a complementului nu).

Totuşi, au fost cercetate şi indicate anumite niveluri, considerate semnificative, prin care anticorpii pot sugera o infecţie virală recentă, mai ales atunci cînd contextul clinic şi epidemiologic concordă.

Dacă — efectuată pe o singură probă de sînge recoltată de la bolnav — investigarea serologică nu oferă indicaţii concludente, ea devine eficientă atunci cînd se examinează două probe de sînge recoltate de la bolnav la un interval care să permită decelarea unor modificări semnificative în nivelul anticorpilor, respectiv o creştere de titru de cel puţin patru ori. În consecinţă, se recomandă ca prima probă de sînge să fie obţinută de la bolnav în primele zile de boală, iar a doua să se recolteze la interval de 10—15 zile, respectiv în a doua sau a treia săptămînă de boală. Infecţia virală este confirmată de seroconversia evidenţiată în funcţie de procedeul folosit : în infecţia urliană prima probă trebuie recoltată foarte devreme în cazul efectuării reacţiei de fixare a complementului, in timp ce pentru reacţia de hemaglutinoinhibare prima probă de sînge se poate recolta la sfîrşitul primei săptămîni de boală ; în proba recoltată aşa de tîrziu se pot găsi anticorpi fixatori de complement la un nivel faţă de care nu se mai sesizează diferenţe semnificative în cea de-a doua. Pe de altă parte, două probe recoltate la un interval foarte apropiat pot să nu deceleze modificări în nivelul anticorpilor. În rare cazuri nivelul anticorpilor nu creşte suficient, chiar într-o perioadă şi cu un interval apreciate în mod curent ca adecvate.

Efectuarea investigării pe două probe face ca, de cele mai multe ori, rezultatele laboratorului să nu fie la îndemînă în momentele de decizie privind tratamentul bolnavului, vaccinarea contacților etc.

Încă din anii '60 s-a stabilit că în cursul infecțiilor, ca și al vaccinărilor primare, anticorpii ce aparțin anumitor clase de imunoglobuline au o evoluție diferită, precum și faptul că în reinfecții sau, respectiv, cu ocazia revaccinărilor, situația este diferită : în primul caz anticorpii de tip IgM apar precoce, de obicei precedînd pe cei de tip IgG, iar ulterior concentrația lor scade mai rapid (IgM și IgA se catabolizează mai repede decît IgG) ; în medie, la 60 de zile de la producerea infecției anticorpii IgM scad foarte mult, aproape pînă la dispariție, iar anticorpii IgG, deveniți preponderenți curînd după apariția lor, continuă să fie prezenți în sînge, la titruri înalte, încă multă vreme (luni și chiar ani). În răspunsul secundar, anticorpii ating repede un nivel înalt, depășind cu mult pe cel înregistrat în cadrul răspunsului primar ; anticorpii IgG sînt preponderenți sau în exclusivitate chiar, deși uneori s-a constatat o producție de anticorpi IgM asemănătoare celei din răspunsul primar ; anticorpii de tip IgA — mai ales cei secretori — ca și cei din subclasa IgG3 par a avea o dinamică similară celei a anticorpilor IgM în răspunsul primar (Linde, 1985) ; anticorpii IgA secretori pot fi decelați chiar în ziua a doua de boală în infecția urliană (Friedman, 1981, 1983) cu maximul la 1—2 săptămîni.

Rezultatele cercetărilor imunologice au permis să se preconizeze stabilirea tipului de anticorpi prezenți în cursul bolii, ca indicator al evoluției actuale sau foarte recente : în unele infecții virale (de exemplu, cele asociate cu virusul Epstein-Barr) anticorpii sînt frecvent la nivelul maxim atunci cînd apar simptomele bolii, iar în altele (de exemplu, varicela sau parotidita epidemică) se pot detecta cu mijloace sensibile chiar din prima sau a doua zi de boală. Identificarea anticorpilor de tip IgM se obține în laborator prin procedee serologice din cele mai variate, fie după separarea imunoglobulinelor serice (ultracentrifugare, cromatografie tratare cu 2-mercaptoetanol sau adsorbții diferențiate), fie fără această prelucrare, apelîndu-se la recunoașterea lor de către antiglobuline specifice marcate cu izotopi, enzime sau fluorocromi.

Numeroase aspecte tehnice ale diagnosticului serologic au beneficiat de introducerea proteinei A stafilococice în arsenalul investigației de laborator ; determinarea anticorpilor IgM s-a ameliorat în mod deosebit.

Examenele serologice au un larg cîmp de utilizare : în diagnosticul etiologic al infecțiilor virale, în determinarea eficienței vaccinării într-o colectivitate, în stabilirea statusului imunitar în situații critice (de exemplu, gravide contacte de rubeolă), în supravegherea seroepidemiologică a colectivității spre a urmări prevalența unei anumite infecții virale etc.

Interpretarea rezultatelor investigației serologice trebuie să țină seama de vîrsta celor în cauză (de exemplu, la fiecare din categoriile — nou-născut, copil, adult — fondul imunoglobulinic, bagajul de anticorpi și răspunsul umoral au caracteristici proprii), de situația vaccinărilor la individ și în colectivitate, de situația epidemiologică în colectivitate etc. ; examene serologice adecvate permit clarificarea unor situații clinice deosebite (de exemplu, în infecții virale congenitale — prin diferențierea anticorpilor de la mamă și de la nou-născut; în hepatita virală B — stabilirea caracterului și stadiului evoluției bolii prin determinarea claselor de imunoglobuline-anticorpi față de antigene HBs, HBc sau HBe, mai ales dacă se asociază și cu identificarea prezenței unora dintre aceste antigene (tabelul 15-XI). În cadrul perfecționării aduse diagnosticului serologic amintim și pe aceea a determinării anticorpilor prezenți în complexele imune circulante.

TABELUL 15-XI

Diagnosticul infecției virale hepatitice B pe baza coroborării datelor de laborator
(după Deinhardt și Grist, 1983)

AgHBs	AgHBe	AcHBe	AcHBc	AcHBs	Interpretarea rezultatelor
+	+	−	−	−	Perioadă de incubație sau de debut a fazei clinice acute
+	+	−	+	−	Hepatită acută/stare de purtător cronic
+	−	+	+	−	Fază tardivă sau stare cronică
−	−	+	+	+	Convalescență după infecție acută
−	−	−	+	+	Restabilire după infecție acută
−	−	−	−	+	Imunizare fără îmbolnăvire prin expuneri repetate sau restabilire după hepatită acută; imunizare fără infecție
−	−	−	+	−	Restabilire după hepatită B fără HBs decelabil; debut, stare de convalescență, infecție cronică

În concluzie, diagnosticul de laborator în infecțiile virale beneficiază în prezent de multiple și sensibile posibilități, așa cum o dovedește și rezolvarea cu un ritm din ce în ce mai alert a unor probleme insolvabile în trecut: hepatitele virale, afecțiunile diareice virale, unele infecții lente și, exemplul cel mai recent, sindromul de imunodeficiență dobîndită; importantă devine acum atitudinea adoptată (perfecționarea procedeelor, asigurarea accesibilității lor, preconizarea asocierii examenelor care să acopere toate aspectele susceptibile de a fi identificate).

Toate aceste procedee prezentate în mod generic, cu referințe la investigarea bolnavilor, se pot folosi și pentru rezolvarea altor domenii în care prezența virusurilor este implicată (mediu exterior, vectori etc.).

15.3.3. MICROSCOPIA ELECTRONICĂ (ME) ȘI IMUNOMICROSCOPIA ELECTRONICĂ (IME)

În afară de faptul că microscopia electronică constituie un mijloc deosebit de cercetare în virusologie, folosirea sa permițînd ca în numeroase infecții virale agentul cauzal să fie cunoscut morfologic și să i se explice aspecte patogenice, astăzi aportul său la diagnostic este cu totul deosebit, devenind un procedeu de rutină pentru anumite situații.

În condiţiile iniţiale ale utilizării ME în virusologie, cînd prelucrările erau numeroase şi de durată (incluzionare, secţionare, umbrire cu metale grele), folosirea sa nu era accesibilă diagnosticului de rutină ; numai odată cu introducerea coloraţiei negative, prin care se identifică nu numai morfologia particulei virale, ci şi detalii de suprafaţă, ME devine mijlocul de referinţă, sensibil şi rapid în rezolvarea unor situaţii clinice şi epidemiologice delicate şi grave (de exemplu, în focare — de import mai ales — ale variolei), ca şi pentru identificarea agenţilor virali implicaţi în infecţii încă neelucidate (de exemplu, identificarea virusurilor în hepatita virală, în afecţiunile digestive acute diareice sau, mai recent, în SIDA).

ME permite identificarea şi deosebirea nu numai de virusuri complet diferite (de exemplu, în fecalele celor cu boală diareică se diferenţiază coronavirusurile de virusurile rota sau de cele adeno ca şi virusul herpetic de cele pox, în cazul unei afecţiuni cu leziuni cutanate), dar chiar şi unele din cadrul aceleiaşi familii (de exemplu, poxvirusuri, ca cel variolic, vaccinal şi cel al nodulilor lăptarilor) cu consecinţe pentru bolnav şi colectivitate (de exemplu, identificarea keratitei herpetice, azi în măsură a fi tratată specific).

Dintre perfecţionările aduse diagnosticului prin ME menţionăm ultracentrifugarea direct pe grilă cînd produsele conţin puţin virus, concentrarea cu polielectroliţi (PE-60) a suspensiei virale (de exemplu, materii fecale) sau aşa-numita criomicroscopie electronică, care constă în înglobarea într-un strat subţire de gheaţă vitroasă a virusurilor fragile, cu păstrarea structurii învelişului (Wang şi colab., 1987).

Examenul prin ME a fost ameliorat în mod deosebit prin introducerea serului imun faţă de virusul în cauză, *imunomicroscopia electronică* în diferite variante asigurînd, pe lîngă o aglomerare şi captare mărită a virionilor pe grilă, o identificare imunologică a lor ; folosirea anticorpilor marcaţi cu feritină (astăzi mai puţin utilizată datorită greutăţii sale moleculare), peroxidază sau aur coloidal realizează aceleaşi avantaje, dar mai ales favorizează studii la nivel ultrastructural.

În afara diagnosticului virusologic propriu-zis, IME este în măsură să satisfacă şi pe cel serologic, prin variante inspirate din procedeele în fază solidă (RIA, RIE) ; durata prelucrării nu depăşeşte pe aceea din procedee ca IF, IPO, RIE, cu avantajul stabilirii rezultatului prin vizualizarea particulelor virale.

Dintre aplicaţiile ME şi ale IME, ca şi din avantajele acestora, pe lîngă cele amintite, trebuie considerate şi cele ce ţin de identificarea agentului viral chiar dacă acesta nu este cultivabil (de exemplu, adenovirusurile necultivabile) (Meng Qing Hai, 1987), ca şi rolul ME şi IME în controlul şi aprecierea performanţelor unor noi procedee de diagnostic virusologic, ele fiind considerate ca metode de referinţă.

IME permite şi precizarea faptului că un agent viral izolat a fost în mod real implicat în infecţia investigată : serul de convalescent reacţionează cu agentul viral izolat în fazele iniţiale ale bolii, examenul prin IME identificîndu-l şi precizîndu-i rolul.

Deşi de mare eficacitate şi mai ales rapiditate, ca în diagnosticul de rutină, ME şi IME sînt însă grevate de posibilităţile de dotare limitate ; totuşi, chiar numai dotarea regională cu aparatură adecvată este în măsură să asigure un diagnostic în timp util, căci, cu transportul probelor cu tot, investigația se finalizează mai rapid și cu sensibilitate mai mare decît multe din metodele la îndemînă în prezent.

Examenul prin imunomicroscopie electronică, ca și cel prin microscopie electronică pentru identificarea particulelor virale se efectuează fie cu material în suspensie, fie pe secțiuni ; colorarea negativă a preparatelor folosește în mod obișnuit acidul fosfotungstic (AFT), dar s-a apelat și la acetatul de uranil sau citratul de plumb.

Materialul de la bolnav este reprezentat de lichide organice, secreții și excreții, țesuturi solide.

În cazul ME, după pregătirea materialului (eventual suspensionarea urmată de clarificarea prin sedimentare simplă sau centrifugare) se depune o picătură pe grila tratată cu Formvar sau colodiu, după care aceasta este pusă în contact cu o picătură AFT 2% și excesul acestuia se îndepărtează cu hîrtie de filtru, apoi preparatul se usucă ; există varianta amestecării suspensiei virale cu soluția contrastantă și din acest amestec se depune o picătură pe grilă și se examinează după uscare. Atunci cînd este vorba de fragmente de organe, acestea se incluzionează și se fac secțiuni ultrafine într-o succesiune de prelucrări care astăzi nu mai depășesc cîteva ore, deci sînt susceptibile și ele de investigare rapidă : prefixare cu glutaraldehidă, fixare cu tetraoxid de osmiu, deshidratare, includere într-o rășină sintetică cu polimerizare la 95°C, secționare, depunere pe grilă și colorare. Obișnuit, examinarea se face cu o mărire de 20 000 pînă la 40 000 de ori și se completează eventual cu cea realizată prin fotografiere ; în acest fel se evidențiază particula virală, forma ei și chiar detaliile de suprafață.

În privința IME, Kurstak și colab. (1977) apreciază că principiile variatelor procedee constau în aglutinarea virusurilor de către anticorpi, captura virionilor pe grilă ori alte suporturi sau îmbrăcarea lor cu anticorpi.

Varianta cea mai obișnuită constă în amestecarea anticorpilor și a suspensiei virale (procedeu direct), eventual cu adăugarea unui ser antiglobulinic (procedeu indirect) urmată de simpla depunere pe grilă (în cazul unei concentrații mari de virus — sucul plantelor) sau prin centrifugare (virus în cantitate redusă — virusuri animale). În alte variante se efectuează o filtrare în agar, prin care se asigură concentrarea virusului pe suprafața grilei ce se depune pe gel.

Tot în cadrul variantelor de IME, se încadrează și cele în care virusul este „capturat“ pe grila îmbrăcată direct cu anticorpi sau pe grila îmbrăcată cu anticorpi prin intermediul antigenului corespunzător sau al proteinei A — ambele fixate în prealabil pe respectiva grilă ; chiar și stafilococul Cowan I poate fi folosit ca suport, legînd virusul prin anticorpii reținuți în prealabil de către proteina A din peretele bacterian.

Grilele astfel pregătite se colorează negativ, eventual după o așa-numită „decorare“ a virusurilor cu anticorpi și aur coloidal.

IME poate fi efectuată și pe secțiuni de fragmente de organe, pregătite în mod similar descrierii făcute pentru examenul prin ME simplă. În acest caz, se folosește fie un procedeu direct, fie unul indirect ; în orice variantă anticorpii au ca markeri feritină sau feritină legată de o lectină, peroxidază, complex peroxidază-antiperoxidază, citocrom C, hemocianină, dar, recent, de mare interes se bucură aurul coloidal. În variantele indirecte, proteina A (PA) cu unul din markerii menționați (aur coloidal, în special) poate înlocui antiglobulina. Recent, s-a apreciat că IME cu PA — aur coloidal este mai sensibilă decît multe alte variante ale ME pentru detectarea virusurilor mici enterice în probe lichide și identifică niveluri scăzute de anticorpi (Doane, 1987). Referitor la aurul coloidal, de subliniat posibilitatea unei duble marcări prin folosirea anticorpilor cuplați cu particule de diferite dimensiuni în gama de la 2 la 150 nm (de obicei 5 și 10 nm), putînd evidenția două virusuri în același timp (tabelul 15-XII).

TABELUL 15-XII

Unele aplicații ale variantelor ME în diagnosticul infecțiilor virale

Sistem viral	Indicații bibliografice
Virusuri rota	Roseto (1980) (virus canin) ; Nicolaieff (1980) ; Beierlein (1980) ; Askaa (1981) (virus porcin) ; Obert (1981) ; Sarv (1981) ; Trepanier (1981) ; Hammond (1982) ; Svensson (1983) (SPIEM) ; Gerna (1984) (SPIEM) ; Stawowska (1984)
Virusuri adeno	Svensson (1982)(SPIEM)
Virusuri arbo	Katz (1980) (SPIEM) ; Tantawi (1980)
Virus citomegalic	Macris (1981)
Virusuri ale plantelor	Shukla (1979) (SPIEM)
Diferite alte virusuri : — poxvirusuri, paramyxovirusuri, virusuri respiratorii, virusul variolic, virusul vaccinal, virusul coriomeningitei limfocitare	Magington (1964) ; Spradbrow (1964) ; Cruickshank (1966) ; Doane (1967) ; Joncas (1969) ; Davis (1970) ; Montplaisir (1970) ; Chaudhury (1972) ; Malțeva (1974) ; Blaierschmidt (1976) ; Donelli (1979) ; Roseto (1980) ; Gelderblom (1980) ; Mahony (1981) ; Berthiaume (1981)
Virusul rabic	Chaudhury (1978) (anticorpi)

Performanțele ME și IME în diagnosticul infecțiilor virale se află într-o primă dependență de recoltarea corectă a materialelor ce se vor examina : în perioada indicată de desfășurare a procesului infecțios și acolo unde virusul este prezent sau se elimină. Un rol important are prelucrarea corectă în scopul eliminării particulelor mari, ca și pentru concentrare, cînd se pot produce pierderi de particule virale.

În ceea ce privește sensibilitatea procedeelor de ME și IME au fost făcute studii atît pentru determinarea concentrației de virus detectat, cît și pentru compararea între diferite variante și cu alte procedee de diagnostic (RIA, RIE, IF etc.).

Obișnuita ME cu colorație negativă poate evidenția în jur de 10^6/g sau mL particule virale ; centrifugarea direct pe grilă asigură o detecție cu 1,5—3 log mai mare decît preparatul necentrifugat și cel puțin o sensibilitate egală cu ELISA (Hammond, 1981).

Variantele de IME au o sensibilitate superioară. Kurstak și colab. citează pentru variantele cu filtrare prin agar detectarea arbovirusurilor la nivel de 10^6/g sau mL și chiar cu 10^4/g sau mL DI_{50} (replica IME) și menționează că cea mai simplă variantă de IME (grila îmbrăcată cu anticorpi) este de aproximativ 9 ori mai sensibilă decît examenul simplu prin ME ; după Katz și Svensson (1983) grila îmbrăcată cu proteina A este și mai sensibilă, dar în mod variabil. Variantele care folosesc anticorpi sau proteină A marcată cu aur coloidal au de asemenea o sensibilitate foarte mare : Louro (1984), în sistemul grilă — virus — anticorp — proteină A — aur coloidal pentru virusuri ale plantelor, obține o sensibilitate de 16—32 de ori mai mare în comparație cu IME simplă.

În infecții rotavirale examenul prin ME poate pune diagnosticul de la primul scaun patologic.

15.3.4. EXAMINAREA PREPARATELOR (FROTIURI ȘI SECȚIUNI) PRIN COLORARE PENTRU MICROSCOPIA OPTICĂ

Examenul preparatelor obținute prin amprentă sau prin etalarea materialului recoltat de la organismul afectat, după colorare prin procedee folosite în mod obișnuit în laboratoarele de microbiologie sau de histologie, a fost recomandat și practicat într-o perioadă în care nu existau posibilitățile actuale ; în prezent nu mai are decît un interes istoric.

Colorarea directă a frotiurilor a constituit unul din procedeele recomandate de către specialiștii OMS pentru diagnosticul de laborator în variolă, chiar pînă în preajma eradicării ei, deoarece dimensiunile relativ mari ale poxvirusurilor permit în anumite condiții vizualizarea virionului colorat. În acest caz se recomandă în special impregnarea argentică după Gispen, deși alte colorații pot oferi rezultate comparabile (de exemplu, Lépine recomanda metoda Nicolau cu izamină fenicată) ; astfel, specialistul poate diferenția particulele colorate maro închis ale virusului variolic de cele ale virusului varicelic.

În unele infecții, colorarea prin metode obișnuite pentru microscopia optică se adresează detectării incluziilor caracteristice în celulele în care virusul respectiv s-a replicat. În mod deosebit, procedeul a servit diagnosticului rabiei atît la animalele suspectate, cît și la cele de laborator inoculate cu probe recoltate de la primele ; evidențierea corpusculilor Babeș-Negri, îndeosebi la nivelul cornului lui Ammon, este patognomonică. Și alte infecții virale au beneficiat de acest procedeu de identificare și diagnostic diferențial, mai ales în cazul unor animale ; ca metode de colorare amintim : Giemsa, Sellers, Mann, Muromțev etc.

15.3.5. EXAMINAREA MICROSCOPICĂ A PREPARATELOR COLORATE CU ANTICORPI MARCAȚI CU FLUOROCROMI SAU CU ENZIME

Astăzi colorarea simplă a fost înlocuită cu procedee moderne de colorare cu ajutorul anticorpilor marcați cu fluorocromi sau enzime ; în primul caz este vorba de folosirea *imunofluorescenței* iar în cel de-al doilea de tehnica *imunoperoxidazică* în mod deosebit.

Imunofluorescența (IF), ca și tehnica imunoperoxidazică (IPO) se adresează materialelor de la bolnavi care conțin celule intacte, în interiorul lor evidențiindu-se antigenele virale ca mase difuze, colorate specific, sau ca formațiuni bine individualizate reprezentînd incluziile caracteristice (de exemplu, corpii Babeș-Negri în rabie); particulele virale ca atare pot fi evidențiate în unele sisteme virale atunci cînd dimensiunile lor, suficient de mari, permit individualizarea virionilor colorați aderenți la periferia unor celule din leziune sau la periferia hematiilor în cursul viremiei (de exemplu, în cazul poxvirusurilor).

În această situație, numai anumite materiale provenind de la bolnav pot fi examinate prin IF sau IPO:

— exsudat nazofaringian recoltat cu tamponul sau prin spălătură;
— spută;
— exsudat conjunctival recoltat cu tamponul;
— urină;
— lichid cefalorahidian;
— secreții genitale recoltate cu tamponul (din uretră, secreție vaginală sau din colul uterin);
— material obținut prin puncționarea și/sau raclarea leziunilor cutanate în afecțiuni eruptive, eventual recoltat cu tamponul.

Materialul se etalează ca atare pe lame sau — cînd este cazul — volumele mai mari, lichide, se omogenizează și apoi se centrifughează, preparatele efectuîndu-se din sedimentul în care s-au depus celulele.

Preparatele se usucă la aer și apoi se fixează în mod adecvat, de obicei cu acetonă, colorarea efectuîndu-se imediat sau după păstrarea frotiurilor în condiții care să nu altereze structura antigenică virală.

Examenul preparatelor la microscopul cu fluorescență identifică antigenul viral la nivelul celulelor sub forma unor mase intens fluorescente (uneori fluorescența granulară este considerată a reprezenta particule virale); în cazul efectuării IPO materialul viral apare ca mase colorate maro-negru, fondul fiind gălbui la examenul microscopic obișnuit.

IF a fost aplicată practic în toate sistemele virale care se pretează la acest examen, considerîndu-se că — în funcție de calitatea reactanților biologici folosiți (potența serurilor specifice antivirale sau a celor antiglobulinice, specificitatea lor) — procedeul poate asigura un diagnostic rapid; imunofluorescența nespecifică — datorată tocmai calității necorespunzătoare a reactanților biologici, ca și unor deficiențe de păstrare și colorare — poate afecta interpretarea rezultatului, dar există posibilități tehnice adecvate pentru atenuarea efectelor sale.

Dintre utilizările mai importante în diagnosticul unor infecții virale menționăm aici doar cazul rabiei (la om, examinarea intravitală a amprentelor de cornee sau a preparatelor de la nivelul pielii, iar post-mortem — preparate de la nivelul creierului) și al infecțiilor herpetice (amprente corneene, material raclat de la baza leziunilor cutanate, ca și material recoltat prin biopsie din creier).

Examenul prin IF este dependent însă de prezența aparaturii corespunzătoare, ca și de existența personalului bine pregătit.

În general, procedeele IPO, deși au performanțe și domenii de utilizare asemănătoare IF și prezintă avantaje numeroase față de aceasta, au încă o pondere mai redusă în activitatea laboratoarelor de diagnostic virusologic ; examenul preparatelor se face la microscopul optic, colorarea se menţine chiar după examinarea prelungită şi controlul rezultatului se poate face oricînd.

15.3.5.1. *Imunofluorescenţa (IF)*

Imunofluorescenţa se bazează pe faptul că anumiţi coloranţi pot fi legaţi covalent de molecule proteice, globulinice în special, pe care le fac vizibile prin expunere la radiaţii ultraviolete în microscopia fluorescentă ; conjugate cu anticorpi, aceste substanţe (fluorocromi) pot localiza antigene — respectiv antigenele virale de la nivelul celulelor infectate — consecutiv — unei reacţii antigen — anticorp în care conjugatul este implicat.

Principiul imunofluorescenţei, aplicat iniţial de Coons (1948) în virusologie, a determinat cercetări numeroase şi astăzi sînt precizate modalităţi şi condiţii prin care se poate realiza un diagnostic rapid, specific şi de mare sensibilitate ; la aceasta contribuie şi faptul că în prezent există la îndemînă conjugate fluorescente de mare eficienţă imunologică şi cu un grad avansat de purificare pentru a evita rezultatele nespecifice. Dacă într-o vreme tehnica indirectă apărea mai atrăgătoare (necesita un conjugat pentru examinarea unor diferite sisteme virale, cu condiţia ca serurile imune corespunzătoare să fie obţinute la aceeaşi specie animală), astăzi, pentru detectarea antigenelor virale, tehnica directă dovedeşte o sensibilitate şi o specificitate superioare prin purificările antigenelor (determinanţilor antigenici, chiar sintetici) şi a anticorpilor preparaţi cu acestea ; anticorpii monoclonali aduc posibilităţi noi în favoarea tehnicii directe. În prezent şi aparatura s-a ameliorat foarte mult, fiind accesibilă la nivelul tuturor laboratoarelor.

Principiul pe care se bazează imunofluorescenţa (localizarea antigenului viral la nivelul celulei cu ajutorul anticorpilor fluorescenţi) în diagnosticul de laborator al infecţiilor virale serveşte pentru :

— evidenţierea antigenelor virale la nivelul celulelor provenind de la organisme infectate — bolnavi — (celule libere în probele recoltate de la aceştia sau pe amprente/secţiuni din materiale recoltate prin biopsie sau la examen necroptic), ca şi din sistemele biologice inoculate cu probele recoltate de la bolnav (animale de laborator, ouă embrionate şi mai ales culturi de celule) ;

— tipizarea virusurilor izolate, examenul IF efectuîndu-se pe preparate din culturi de celule în mod special ;

— în fine, evidenţierea anticorpilor (investigaţie serologică prin IF), preparatul antigenic fiind reprezentat de celule din culturi infectate cu virusuri.

Dintre modalităţile de colorare prin imunofluorescenţă, principalele sînt (fig. 15-1) :

— tehnica directă, în care preparatele pe lamă sînt tratate cu un conjugat specific, iar după înlăturarea acestuia şi spălare corespunzătoare se montează sub lamelă şi apoi se examinează.

— În tehnica indirectă, într-un prim stadiu se folosește un ser imun fără marker; după îndepărtarea acestuia și spălarea preparatului, se tratează cu un conjugat fluorescent provenind dintr-un ser antiglobulinic corespunzător speciei de la care s-a obținut serul antiviral și abia apoi preparatul spălat se montează sub lamelă. În ultima vreme, în locul acestui conjugat antiglobulinic se preconizează un conjugat proteină A — fluorocrom, datorită avantajelor sale.

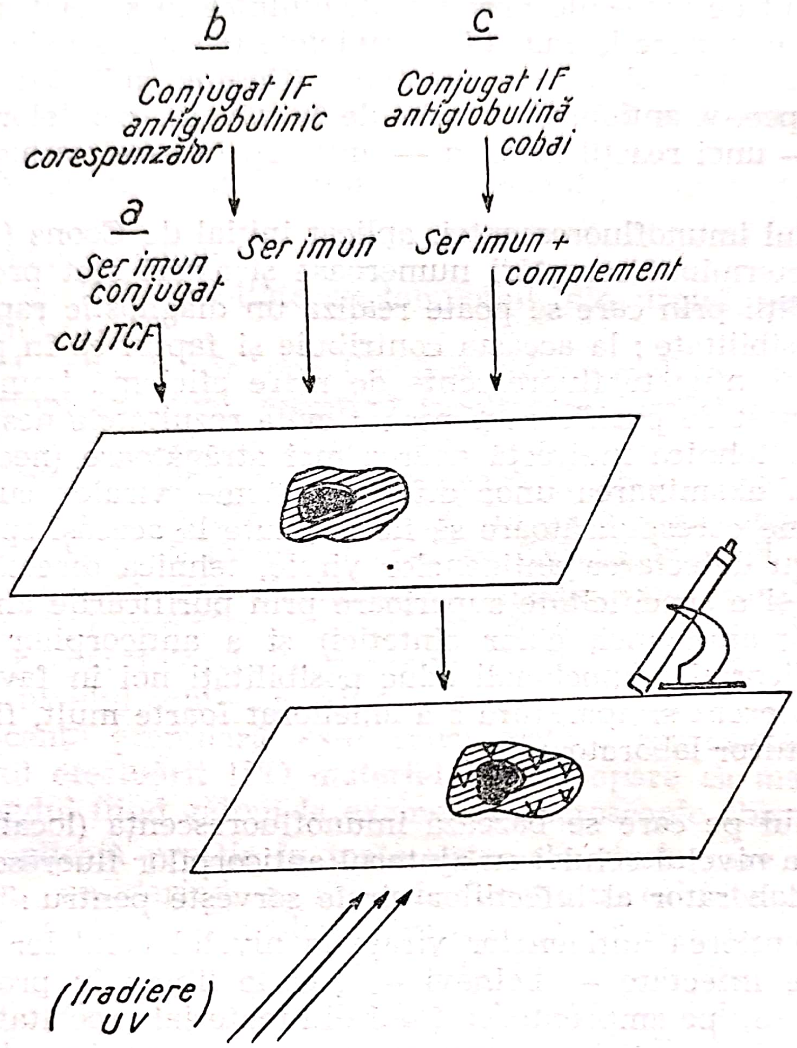

b
c
Conjugat IF antiglobulinic corespunzător
Conjugat IF antiglobulină cobai
a
Ser imun conjugat cu ITCF
Ser imun
Ser imun + complement
(Iradiere UV)

Fig. 15-1 — **Principalele procedee de colorare pentru imunofluorescență.**
a — tehnica directă; b — tehnica indirectă; c — tehnica de colorare a complementului.

— În fine, în tehnica de colorare a complementului, după ce preparatul a fost tratat cu ser specific se adaugă complement, care este reținut de către complexul antigen — anticorp; colorarea preparatului necesită un conjugat anticomplement, respectiv antiglobulină de cobai.

În această ordine, tehnicile apar avantajoase: tehnica indirectă are nevoie de un conjugat față de seruri adresate mai multor virusuri, dar care sînt preparate pe aceeași specie animală (de exemplu, un conjugat anticobai sau un conjugat antiiepure), iar cea de colorare a complementului folosește doar un conjugat anticobai.

În privința elementelor care participă la examenul prin IF :

— Conjugatele se prepară cu seruri obținute prin imunizarea animalelor cu antigene virale cît mai purificate și trebuie să fie suficient de puternice pentru a fi folosite într-o diluție care să elimine o colorare nespecifică ; eventual, sursa de anticorpi este reprezentată de lichidul de ascită produs prin inoculare de celule tumorale Ehrlich sau de sarcom T 180 la șoarecii deja imunizați. Seruri umane pentru patologia corespunzătoare pot fi utile uneori, dar frecvent conțin o gamă foarte largă de anticorpi față de virusuri, ceea ce reduce specificitatea lor. Conjugarea se face în prezent exclusiv cu imunoglobulinele izolate din aceste seruri, altfel conjugarea concomitentă a fluorocromului cu albumina serică ar mări incidența rezultatelor false ce țin de colorări nespecifice.

— Conjugarea se obține cu numeroase substanțe, dar fluorocromii cei mai utilizați astăzi au rămas izotiocianatul de fluoresceină și rodamina (ITCF și respectiv RB 200) care oferă culori diferite, ceea ce favorizează colorări simultane sau diferențiate pentru antigene diferite. Printre condițiile de conjugare, un anumit raport fluorocrom/proteină este absolut necesar, după cum purificarea ulterioară elimină colorantul nefixat sau poate să se adreseze chiar globulinelor conjugate dar care nu au activitate specifică — procese menite să evite colorările nespecifice.

— Preparatele constau din celule aflate în suspensie în diferite produse de la bolnav sau în culturi de celule, dar și din secțiuni incluzionate sau din amprente (de exemplu, amprentă de cornee în diagnosticul rabiei) ; acetona este fixatorul preferat în investigația sistemelor virale, dar se folosește și alcoolul metilic sau formolul. În prezent, s-au preconizat modalități de prelucrare care să asigure examenul prin imunofluorescență și pentru preparatele incluzionate în parafină.

Pentru montarea preparatelor, soluția de glicerină în tampon fosfat (raport 9 : 1) sau Elvanolul (polivinilalcool) 1/5 au cea mai largă utilizare ; un pH mai ridicat pare să favorizeze fluorescența în comparație cu cel de 7,0—7,2 al tamponului fosfat ; s-a recomandat și un amestec de 9 părți glicerină cu 1 parte formol, asigurîndu-se astfel și o fixare progresivă a preparatului.

— Examenul microscopic cu iluminare prin obiectiv are avantaje față de cel clasic prin transmisie ; în orice caz, sticla (lama și lamela) trebuie să fie lipsită de fluorescență proprie, iar iradierea prelungită a preparatului face ca imaginea să se șteargă.

Imaginea caracteristică antigenului viral investigat apare ca mase mai mari sau mai mici (chiar punctiforme, mai ales la periferia celulelor sau hematiilor), cu localizare citoplasmatică sau nucleară ; poate fi vorba de material antigenic încă neîncorporat în particula virală, de aglomerări de virusuri, eventual incluzii. Aceste materiale au o fluorescență galben-verde cînd fluorocromul este ITCF sau portocalie în cazul rodaminei și trebuie să contrasteze cu fondul întunecat, necolorat al frotiului.

Frecvent, colorarea nespecifică a frotiului împiedică o interpretare corectă a rezultatului ; printre metodele de evitare a acesteia se recomondă o supracolorare cu albastru Evans (1/5 000 ori 1/10 000) sau cu albumină bovină conjugată cu rodamină, ca și tratarea cu K tiocianat (Greerhorn, 1982).

Conjugatul proteină A — ITCF are și avantajul lipsei unei colorații nespecifice, putîndu-se folosi la o diluție suficient de mare, pe lîngă posibilitatea de a înlocui în tehnica indirectă sau de colorare a complementului, conjugatul antiglobulinic corespunzător. Anticorpii monoclonali marcați cu ITCF evită de asemenea colorarea nespecifică sau reacții încrucișate.

IF este folosită în diagnosticul de laborator al infecțiilor virale :

1. în diagnosticul infecțiilor virale, prin identificarea antigenelor virale în celulele din diferite materiale recoltate de la bolnav ; literatura de specialitate și activitatea desfășurată în țară oferă numeroase exemple. În mod obișnuit, IF se adresează infecțiilor căilor respiratorii (virusuri gripale și paragripale, adeno- și coronavirusuri și mai ales virusul respirator sincițial, care este foarte labil în condiții de laborator), celor cu manifestări cutanate (virusuri herpetice și poxvirusuri), infecțiilor la nivel ocular (virusuri herpetice, adeno etc.), afecțiunilor genitale (în special cea herpetică), iar ocazional au fost cercetate celulele din spută pentru decelare de antigen rujeolic sau urlian, precum și urina cu decelare în celule de antigen CMV sau urlian. În infecția rabică, animalele inoculate (ca și cele bolnave, de altfel) se investighează prin IF, în primul rînd la nivelul SNC, dar se fac și frotiuri prin amprentă din cornee sau celule din piele (Ciuchini, 1984) ; IF este modalitatea de rutină cea mai acceptată înlocuind vechile examene pe frotiuri colorate, pentru evidențierea corpilor Babeș-Negri. Infecția herpetică, mai ales cea de la nivel ocular, beneficiază de un diagnostic util pentru stabilirea administrării de medicamente ; în encefalita herpetică, posibilitatea unei chimioterapii corespunzătoare face să se recomande examinarea IF a materialului recoltat de la nivelul creierului prin biopsie. De altfel, infecțiile la nivelul SNC pot fi investigate și prin examinarea IF a celulelor sedimentate din LCR.

Realizări interesante ale examenului IF au mai fost obținute în hepatita virală pe material bioptic (AgHBs), în rujeolă (antigen viral în celulele faringiene etc.), ca și identificarea virusului varicella-zoster, care, fiind strîns asociat cu celulele, se izolează mai greu.

Important este faptul că antigenul viral se identifică în celule provenind de la nivelul replicării sale în organism (de exemplu, conjunctivă sau mucoasă vaginală) chiar dacă virusul nu se mai poate izola. Tocmai de aceea, uneori apare greu de stabilit etiologia afecțiunii actuale, cînd într-un material patologic se decelează mai multe antigene virale conținute, bineînțeles, de celule diferite.

Rezultatele IF se corelează în general cu cele obținute prin procedee obișnuite de izolare ca și cu alte procedee moderne de evidențiere a antigenelor virale : 88—100% IF pozitivă în infecții respiratorii, dar numai 60% IF pozitivă în infecții genitale față de 80% izolări. Pe de altă parte, au fost semnalate uneori rezultate fals pozitive (de exemplu, pînă la 48% rezultate pozitive ale examenului IF în cazuri care nu s-au dovedit a fi variolă). De aceea, se recomandă frecvent ca IF să fie considerată încă drept un complement al procedeelor de izolare, care trebuie să o confirme ; se subliniază, de asemenea, importanța îndemînării celor care utilizează IF.

În afara examenului produselor patologice, IF se pretează la examinarea celor obţinute din sistemele biologice inoculate, chiar mai înainte de apariţia manifestărilor caracteristice şi a identificării prin procedee curente ; astfel diagnosticul IF rezolvă produse patologice chiar dacă acestea nu conţin celule, dar au fost inoculate pe culturi de celule care se examinează precoce. În cazul unor probe din leziuni herpetice sau spălături bronşice, inocularea prin centrifugare pe celule MRC-5, combinată apoi cu anticorpi monoclonali fluorescenţi, permite identificarea CMV chiar la 16 ore (Wirgart, 1987).

Imunofluorescenţa permite de asemenea o identificare şi o tipizare separată a izolatelor virale.

2. Dacă pentru detectarea antigenelor virale în materialele provenind de la bolnav sînt utilizabile toate trei variantele de IF, tehnicile de tip indirect (ca atare sau cea de colorare a complementului) servesc şi la detectarea anticorpilor în serurile investigate. În acest scop, lamele cu „preparate“ ce conţin antigenul viral corespunzător se tratează cu serul bolnavului (ca atare sau în diluţii) pentru ca, în continuare, să se folosească antiglobulina conjugată în ITCF sau complementul urmat de conjugatul anticobai.

„Preparatul“ viral este reprezentat de celule din culturi în care s-a inoculat virusul corespunzător ; obţinerea acestor celule se realizează în moduri diferite :

— celule cultivate pe lamele (în tuburi obişnuite sau de tip Barski), pe lame cu godeuri sau arii marcate prin siliconare ori prin folosirea unor inele ; la confluare, celulele se inoculează (de exemplu, 200 $DICT_{50}$ *per* arie) şi se prelucrează (fixare şi colorare), cînd leziunile focale ocupă 15—20% din suprafaţa pînzei ;

— celule cultivate în monostrat şi infectate se dispersează mecanic sau prin verso-tripsinizare, cînd lezarea afectează 15 —20% din suprafaţa monostratului, din suspensia de celule pregătindu-se frotiuri în spoturi (picături de 0,20—0,1 mL cu aproximaţie 2×10^5 celule/mL) care după uscare se fixează ;

— celule cultivate şi inoculate în suspensie, folosite ca şi cele descrise mai înainte.

Nevoile laboratorului au făcut să se recomande modificări prin care să se obţină „preparate“ virale cu specificităţi multiple (spoturi cu amestec de celule care conţin fiecare alt tip de antigen ; cultivare simultană pe lame, pe arii separate, fiecare arie fiind inoculată cu alt virus).

Celulele se aleg în funcţie de sensibilitatea lor (tabelul 15-XIII) ; în mod deosebit se recomandă celulele Raji sau cele provenind din sarcomul osteogenic uman, pentru că ambele suportă infectarea cu o gamă foarte largă de virusuri, adesea această infecţie devenind cronică.

Păstrarea celulelelor infectate se face cel mai adesea ca preparate deja fixate pe lame, recomandîndu-se temperatura de —20°C, termenul de folosire fiind de mai multe luni ; suspensiile de celule se pot menţine la +4°C (după ce au fost fixate sau conservate prin frig în soluţii stabilizatoare).

TABELUL 15-XIII

Unele culturi celulare folosite în serologia IF

Virusuri cultivate	Tipuri de celule
V. citomegalic	Diploide de om, MRC-5
V. herpetic	HEp-2, MRC-5, Vero
Rhinovirusuri	HeLa
Poxvirusuri	HeLa, HEp-2, fibroblaste de embrion de găină
Rotavirusuri	BS-C-1
Arbovirusuri	HEp-2, ICRM-23, RCA, BHK, fibroblaste de embrion de găină
V. urlian	RCA
V. respirator sinciţial	HEp-2
V. gripale şi v. paragripale	MK, HEp-2
Diferite	Raji

Cel mai frecvent, pentru fixarea celulelor etalate pe lame sau lamele, se recomandă acetona, dar alcoolul metilic s-a dovedit de asemenea eficient ; în suspensie, celulele se fixează cu paraformaldehidă sau glutaraldehidă (tabelul 15-XIV).

TABELUL 15-XIV

Metode de fixare a celulelor în vederea examenului serologic prin IF

Modalitate de prezervare	Indicaţii bibliografice
Glutaraldehidă	Zaia (1977)
Metanol	Tardy Pani (1980)
Paraformaldehidă	Simon (1977)
Crioprezervant	Fishaut (1980)
Acetonă	Marea majoritate a autorilor

În serologia adresată antigenelor de membrană s-a recomandat ca celulele să nu se fixeze ; după dispersare, celulele, eventual inactivate prin iradiere UV, sînt distribuite în godeuri (eprubete) ce conţin diluţii de ser. După spălările de rigoare se adaugă conjugat şi apoi celulele se depun pe lame, se usucă şi se montează pentru examinare.

La investigarea serurilor de la bolnav sînt obligatorii coloraţii de control cu ser sigur pozitiv şi, respectiv, sigur negativ.

Prin IF se determină global încărcătura de anticorpi a serului sau se stabileşte concomitent şi apartenenţa lor la una din clasele de imunoglobuline ; se foloseşte, deci, fie un ser antiglobulină de om, fie seruri specifice faţă de IgG şi IgM (în mod obişnuit), IgA, subclase de IgG etc.

Datele publicate pînă în prezent atestă o bună corelare între rezultatele serologiei prin IF şi cele obţinute prin alte procedee clasice sau moderne, încît în numeroase laboratoare procedeul de care ne ocupăm a devenit unul de rutină (Simon, comunicare personală, 1979).

Totuși, examenul serologic ridică unele probleme :

— Diferența de susceptibilitate a celulelor față de virusuri impune sincronizarea infectării diferitelor culturi de celule cu virusuri variate, în scopul recoltării simultane a celulelor pentru prepararea lamelor polivalente.

— Rezultatele pot fi eronate datorită prezenței receptorilor pentru IgG la nivelul membranei celulare, ca urmare a infectării lor cu anumite virusuri (în special virusuri herpetice), situație pentru care au fost indicate modificări, precum folosirea stafilococului Cowan I marcat cu ITCF în loc de conjugat antiglobulinic (Simon, 1977), a frotiurilor obținute cu nuclei izolați din celula infectată (Mintz, 1980), ca și tratarea preparatelor cu nonidet P-40 (Tardy Panit, 1980).

— În cazul determinării claselor de imunoglobuline, intervenția factorului reumatoid sau blocarea antigenului viral de către excesul de anticorpi IgG determină reacții fals-pozitive și respectiv fals-negative în situația folosirii conjugatului față de IgM ; ca remediu accesibil și rapid se recomandă — printre altele — adsorbția serurilor cu stafilococ Cowan I (Chantler, 1976).

— Referitor la colorațiile nespecifice care apar în cursul investigației serologice prin IF și la posibilitatea evitării lor prin folosirea conjugatului de proteină A, trebuie avut în vedere că aceasta indică aproape în exclusivitate IgG și deci ar putea înregistra titruri reduse.

În concluzie, procedeul IF apare ca unul deosebit de util laboratorului, de o mare accesibilitate, oferind rezultate cu mare sensibilitate și specificitate (bineînțeles în măsura în care preparatele biologice sînt foarte specifice), permițînd identificarea etiologică rapid (înainte de rezultatele unor procedee considerate „clasice“), simplificînd examenele serologice ; îndemînarea celui care întrebuințează procedeul ca și experiența cîștigată cu timpul stabilesc valoarea acestui procedeu.

Progrese recente s-au dovedit în măsură să ridice sensibilitatea și specificitatea reacției de diagnostic prin IF, în tehnica indirectă sau directă, pentru identificarea antigenelor virale ;

— folosirea anticorpilor monoclonali în procedee directe sau indirecte, pentru detectarea virusurilor respirator sincițial și citomegalic (Stokes și colab. și Kadi și colab., respectiv Hayie și colab. ca și J. Cello și colab.) (Congresul de Virusologie de la Edmonton, 1987) ;

— în serologia prin IF este de menționat și introducerea unor principii tehnice diferite, precum : ca preparat antigenic — hematii îmbrăcate cu antigen, antiglobulină de om cu biotină și respectiv avidină cu ITCF (Döller și colab., 1985).

15.3.5.2. *Procedee imunoperoxidazice (IPO)*

Procedeele imunoperoxidazice folosesc pentru diagnosticul infecțiilor virale aceleași principii și modalități practice ca și imunofluorescența : antigenul viral de la nivelul celulei formează cu anticorpul corespunzător un complex antigen — anticorp care se evidențiază printr-o reacție citochimică declanșată de peroxidază (PO), enzimă-marker a anticorpului respectiv (anticorpul specific în cazul reacțiilor de tip direct, antiglobulina atunci cînd se practică o reacție indirectă) ; în cursul acestei reacții, substratul peroxidazei (3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorică) în prezența H_2O_2 se transformă într-un compus fenazinic insolubil, maro-negru, vizibil ca atare la examinarea preparatului cu microscopul obișnuit ; produsul devine electronoopac prin adăugarea tetraoxidului de osmiu care este redus (Kurstak C., 1982 ; Ward, 1984).

În afara peroxidazei, au fost cuplate cu anticorpii și alte enzime, dintre care reamintim citocromul C, cu molecula mai mică și mai ieftin decît peroxidaza, dar cu o activitate mai slabă ; derivate din aceasta, microperoxidazele cu moleculă mică pot fi cuplate și cu fragmente Fab, provenind din imunoglobulina-anticorp, iar conjugatele de dimensiuni reduse pătrund mai ușor în celula unde se află antigenul.

Conjugarea cu PO ridică probleme precum randamentul redus al procesului și afectarea activității biologice a anticorpilor ; ameliorări se obțin prin folosirea unor agenți bifuncționali sau legarea enzimei la anticorp prin intermediul porțiunii carbohidrat propriu. Dar procedeul evită problema cuplării dacă se întrebuințează complexe solubile PO — anti-PO.

Preparatul asupra căruia se desfășoară reacția imunoperoxidazică constă din celule : atunci cînd se urmărește detectarea unor antigene virale în materialele recoltate de la bolnav, acestea se prelucrează în mod adecvat spre a se obține un depozit de celule care se etalează pe lamă ; avînd ca „preparat“ antigenic celule inoculate în prealabil cu virusuri cunoscute, procedeul poate fi folosit — la fel ca și IF — pentru identificarea anticorpilor.

Principalele variante tehnice ale procedeului IPO sînt (fig. 15-2) :

— tehnica directă, în care preparatul este tratat mai întîi cu conjugat specific iar după spălare, prin care se îndepărtează acesta, se adaugă substratul ;

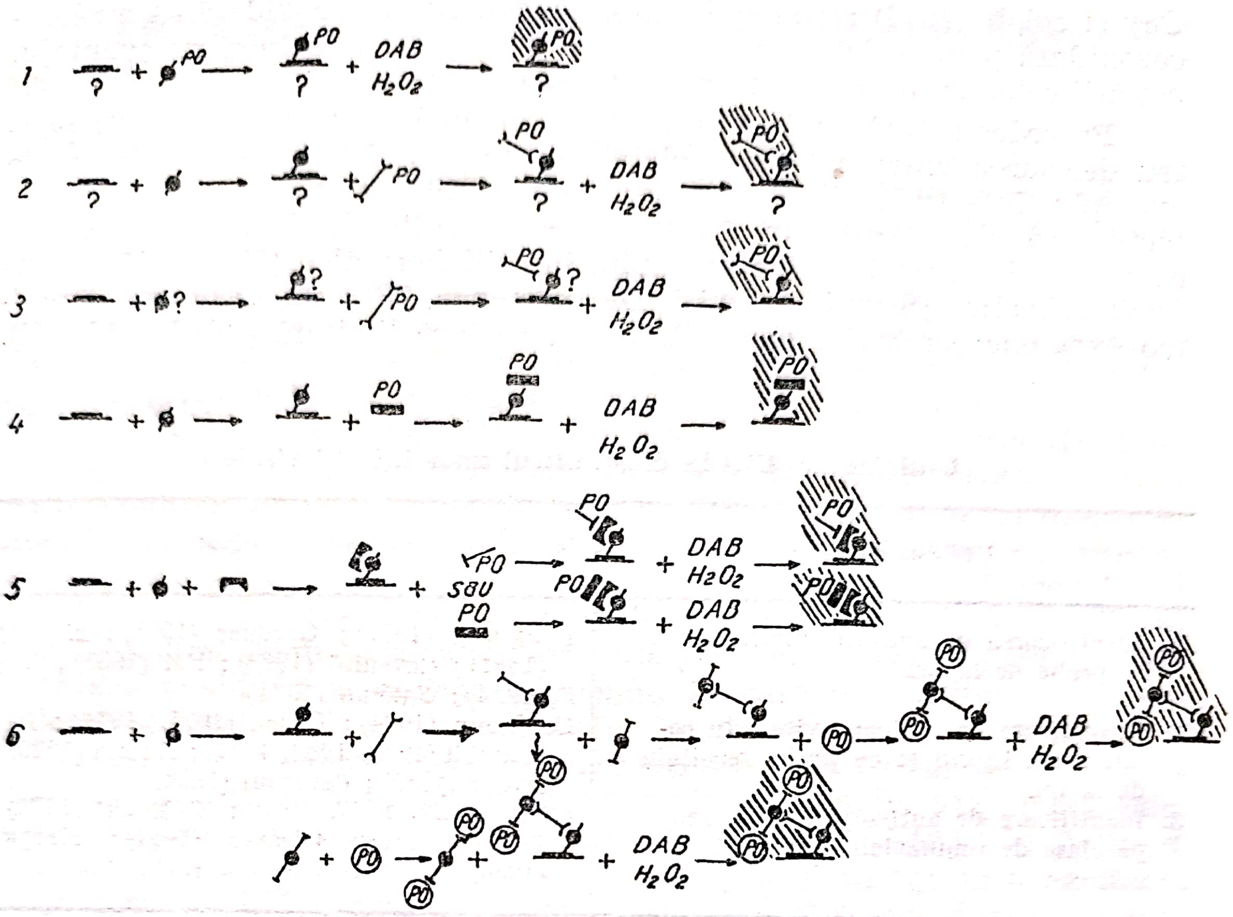
— tehnica indirectă, care folosește anticorpul specific în prima etapă și abia apoi cunjugatul antiglobulinic corespunzător primului anticorp ; în final, preparatului i se adaugă substratul necesar ;

— în anumite situații apare convenabil ca după tratarea preparatului cu ser imun să se adauge complement și apoi conjugatul care se adresează acestuia din urmă (de exemplu, conjugat antiglobulină de cobai) ;

— în fine, Sternberger (1974) a imaginat varianta PO — anti-PO (PAP) prin care se elimină slaba eficiență a conjugatului PO — anticorp, înlocuit cu un complex preformat în care activitatea peroxidazei nu este afectată. Procedeul are avantaje : reduce pierderea de activitate specifică din cursul conjugării, reduce nespecificitatea și evită interferența anticorpilor necuplați ; prezintă dezavantajul unei molecule prea mari, care nu poate pătrunde în celule (Jalowayski, 1987).

Înlocuirea conjugatelor globulinice cu unul PO — proteină A stafilococică a simplificat varianta indirectă atît în detectarea antigenului, cît și în examenele serologice.

— Tehnica de colorare IPO în vederea examenului electronooptic are ca etape principale : prefixarea, incubarea cu conjugat, fixarea, incubarea cu substrat pentru revelare enzimatică, postfixarea cu OsO_4, deshidratarea, includerea.



1 — detecție directă a antigenului viral în celulă ; *2* — detecție indirectă a antigenului în celulă ; *3* — detecție indirectă a anticorpului ; *4* — detecție indirectă a antigenului sau anticorpului cu proteina A ; *5* — detecție indirectă cu complement și conjugat anticomplement ; *6* — detecție indirectă prin varianta PAP ; ▬ — celulă cu antigen viral (control) ; ▬? — celulă cu antigen viral (în produs patologic) ; ø — anticorp antiviral (ser imun) ; ø? — anticorp antiviral (sînge bolnav) ; ⟋ — antiglobulină ; ▬ — proteină A ; ▬ — complement ; ┴ — anticorp anticomplement ; øPO , ⟋PO , PO▬ — anticorp (ser imun), antiglobulină ; proteina A marcate cu peroxidază ; Ⓟ — peroxidază (antigen) ; ø — anticorp anti-Po ; ▨ — reacție de culoare.

Antigenele se pot detecta prin oricare din variantele menționate, dar examenele serologice nu pot folosi varianta directă și nici cea PAP ; varianta anticomplement este mai eficientă și avantajoasă, necesitînd un singur conjugat, indiferent de specia de la care provin serurile.

În procedeele IPO se înregistrează uneori rezultate false datorate unei colorări nespecifice ce ține fie de peroxidazele endogene, fie de reținerea nespecifică a conjugatului la nivelul celulelor ; conjugatul PO — proteină A înlătură acest ultim inconvenient, căci poate fi mult diluat (1/100—1/200) și colorarea de fond nu se mai produce — mai ales că nici nu răspunde la receptorii IgG de pe membrana celulei infectate —, dar trebuie să se țină seama că se adresează aproape exclusiv anticorpilor de tip IgG. Există posibilitatea neutralizării PO endogene (de exemplu, cu metanol) dar, uneori, cu prețul afectării și a antigenului viral.

Gay și colab. (1984) recomandă un procedeu cu glucozoxidază — antiglucozoxidază pentru detectarea antigenului herpetic în celule, cu avantajul evitării colorării nespecifice prin peroxidaza endogenă.

Procedeele IPO au fost preconizate în unele sisteme virale atît pentru decelarea antigenelor în celulele ce provin direct de la bolnav [de exemplu, infecții cu RSV la copii (Gerna, 1980 și Cevenini, 1983), infecții herpetice (Benjamin, 1974)], cît și în culturile de celule inoculate cu materialul infectant [de exemplu, infecții herpetice (Miller, 1983), infecții rubeolice (Schmidt, 1981)]. De asemenea, IPO s-a recomandat pentru examene serologice dar utilizarea este încă limitată (tabelul 15-XV).

TABELUL 15-XV

Utilizări ale IPO în diagnosticul unor infecții virale

Utilizări ale IPO	Indicații bibliografice
1. Identificarea de antigene virale direct în probe de la om	Benjamin (1977); Gardner (1978); Moesley (1981); Cevenini (1983); Pal (1983); Gay (1984); Salmon (1984)
2. Identificare de antigene virale în celule după inoculare cu probe recoltate de la om	Benjamin (1974); Gerna (1975, 1976); Schmidt (1978, 1980, 1981); Haikin (1980); Miller (1983); Cevenini (1984)
3. Identificare de anticorpi (global sau pe clase de imunoglobuline)	Gerna (1976, 1977, 1980); El Mekki (1979); Haikin (1980); Gleaves (1984); Karpas (1985)

Tehnica indirectă oferă posibilitatea decelării claselor de imunoglobuline cărora le aparțin anticorpii, folosind pentru aceasta conjugate adecvate față de IgG sau IgM. Gerna și Chambers (1977) consideră IPO superioară IF, prin absența colorărilor nespecifice la diluții joase de ser atunci cînd se investighează anticorpii de tip IgM.

Utilizarea variantei PAP are o arie mai restrînsă (serologia în patologia umană ar necesita un preparat antiperoxidazic obținut pe om), mai ales că se adresează în special antigenelor de membrană, molecula mare a complexului pătrunzînd cu greu în celulă. Procedeul PAP capătă noi perspective odată cu folosirea anticorpilor monoclonali (ca anticorp de legătură se folosește cel antișoarece preparat pe capră iar în complexul PAP se include unul de origine murină).

În privința performanțelor procedeelor IPO semnalăm sensibilitatea mare, larga accesibilitate, posibilitatea păstrării preparatelor pentru reexaminări spre deosebire de cele colorate IF.

Referitor la sensibilitate, de exemplu în diagnosticul herpesului, se obțin rezultate la 18—24 de ore de la inocularea culturilor de celule, de cinci ori mai repede decît apariția ECP (Miller, 1983), iar în infecția rubeolică rezultatul pozitiv apare la 10 zile după inocularea culturilor de celule în loc de 17 prin IF (Schmidt, 1978, 1981). Pe de altă parte, Karpas și colab. (1985) apreciază că detectarea anticorpilor față de HTLV-III la cei cu SIDA se face prin procedeu IPO cu o sensibilitate similară cu RIA sau RIE, demonstrîndu-se chiar mai puține rezultate fals pozitive.

15.3.6. PROCEDEE IMUNOENZIMATICE, RADIOIMUNOLOGICE ȘI FLUOROIMUNOLOGICE*

Cronologic, procedeele radioimunologice (RIA) s-au dovedit primele în măsură să asigure o sensibilitate și o specificitate deosebit de ridicate investigațiilor menite să determine parametri imunologici foarte diferiți (de exemplu, în endocrinologie, microbiologie, toxicologie etc.) (Yalow și Berson, 1960). RIE, cu varianta ELISA, siglă care astăzi și-a extins semnificația inițială dedicată determinărilor de anticorpi la aproape toate tipurile de variante procedurale, în concepție similară celei RIA, folosește o enzimă în loc de radioizotop în marcarea unui anticorp sau antigen cunoscut, cu avantaje principale legate de cost și factori de siguranță (protecție) (Engvall și Perlmann, 1971). În ultima vreme, marcarea reactanților imunologici cu fluorocromi s-a dovedit utilă nu numai în procedeele folosite de mai multe decenii pentru localizarea antigenelor sau anticorpilor la nivelul celulelor — inclusiv la acela al bacteriilor și paraziților — în deja clasica imunofluorescență introdusă de Coons (anii '50), ci și pentru recunoașterea reacțiilor imunologice prin fluorescență sau modificarea acesteia în mediile în care interacțiunea antigen-anticorp se produce.

O caracteristică comună acestor procedee este folosirea unui reactant imunologic legat de un marker izotopic, enzimatic sau fluorigenic, acesta putîndu-se identifica fie direct (de exemplu, RIA), fie indirect, prin acțiunea asupra unui substrat (de exemplu, RIE) sau prin excitarea sa în spectrul UV pentru a-l pune în situația să-și dezvăluie prezența prin propria manifestare (de exemplu, FIA).

În stadiul actual al dezvoltării tehnice, în marea lor majoritate, variantele procedurale intră în categoria celor ce necesită separări ale rezultatelor interacțiunii antigen — anticorp pentru a asigura măsurarea markerului intrat în reacție (respectiv rămas liber) — procedee în fază neomogenă ; posibilitatea de folosire a unor noi produse (de exemplu, unii polimeri organici, precum policarbonatul, polivinilul, polistirenul etc.) pe care să se fixeze în fază solidă (prin simplă adsorbție sau cu ajutorul unor reactivi de legătură) reactanții imunologici, în principal (antigene, anticorpi), dar și alții, cu rol indirect de reținere a lor (de exemplu, proteina A stafilococică, Clq etc.) a facilitat succesiunea etapelor de lucru și accesibilitatea procedeelor de bază la nivelul tuturor laboratoarelor, deschizînd o nouă perspectivă în mod deosebit diagnosticului rapid în infecțiile virale.

15.3.6.1. *Procedee fluoroimunologice (FIA)*

Dintre noile procedee imunologice, prin marea lor sensibilitate se detașează cele fluoroimunologice, care, așa cum am menționat, se bazează pe identificarea interacțiunii antigen — anticorp prin fluorescența prezentă la nivelul dispozitivului de reacție, fără localizarea acesteia la nivel celular.

---

* În text au fost adaptate siglele cu acceptarea internațională cea mai largă spre a permite o asimilare rapidă a lucrărilor de specialitate din literatura străină.

Şi în cadrul FIA s-au preconizat procedee omogene, în care nu se pune problema separării unor componente participante sau care rezultă în reacţie, ci este vorba de modificări ale gradului fluorescenţei ; în stadiul actual, utilizarea acestor procedee pare mai puţin posibilă pentru diagnosticul infecţiilor virale. Iată principiul unora dintre ele (Memorandum OMS, 1984) :

În metoda de *polarizare a fluorescenţei* este vorba de modificarea polarizării emisiei fluorescente în cazul în care un anticorp se fixează de antigenul ce poartă markerul, fenomenul fiind legat de micşorarea mişcării browniene ca urmare a acestei interacţiuni. Dintre neajunsurile atribuite metodei, notăm posibilitatea de detecţie numai a antigenelor mai mici de 20 000 daltoni. Procedeul se bazează pe o creştere a fluorescenţei după cuplarea antigenului marcat cu anticorpul.

Realizîndu-se în principiu prin competiţie, metodele de *stingere a fluorescenţei* funcţionează astfel : antigenul care poartă fluorocromul (de exemplu, ITCF reacţionează cu anticorpul cuplat cu o substanţă ce-i poate absorbi emisia fluorescentă (de exemplu, rodamina) ; prezenţa antigenului corespunzător nemarcat inhibă activitatea conjugatului anticorp — rodamină şi astfel evită stingerea fluorescenţei. Au fost elaborate deja variante procedurale, printre care şi cele în care, din anticorpii folosiţi în reacţie, o parte poartă ITCF, o parte substanţa activă în stingerea fluorescenţei.

Procedeele neomogene, în care — la fel ca în RIE sau RIA — se realizează o separare a produselor de reacţie, au căpătat deja o aplicare promiţătoare în domeniul diagnosticului infecţiilor virale beneficiind de avantajele fazei solide îmbrăcate cu un reactant imunologic, la fel ca în cazul celorlalte două procedee.

În varianta patentată la vremea respectivă (FIAX), suportul (polimer obişnuit folosit în astfel de reacţii, de exemplu, sub forma de beţişor, eventual aplatizat la un capăt) este îmbrăcat cu reactant (Benjamin şi colab., 1980 ; Friedman şi colab., 1981).

Detecţia antigenului foloseşte faza solidă îmbrăcată cu anticorpi de captură, iar identificarea apelează la globuline specifice, marcate cu fluorocrom. Pentru detectarea anticorpilor virali, o faţă a lamelei din material plastic se îmbracă cu antigen viral, în timp ce pe cealaltă se fixează materialul de control ; introducerea capătului îmbrăcat al lamelei în serul bolnavului este urmată de reacţionarea cu antiglobulina fluorocromată ; rezultatul acestei reacţii de tip indirect reiese din compararea valorii emisiei fluorescente a probei cu cea de pe suprafaţa de control. Sensibilitatea procedeului, deosebit de bună mai ales în investigaţiile serologice, este grevată în determinările de antigen de eventuala fluorescenţă de fond proprie materialelor plastice. Acest tip de investigare a condus la realizarea unei aparaturi moderne, capabilă să înregistreze, să interpreteze şi să afişeze rezultatul rapid şi simplu.

De la această variantă de determinare fluoroimunologică în fază solidă, se afirmă în ultimii ani un procedeu de o deosebită sensibilitate pentru determinarea antigenelor şi anticorpilor virali, în care se elimină fluorescenţa de fond ; se apreciază eficienţa sa ca fiind cel puţin egală cu RIA sau RIE. În această *probă de determinare în timp a fluores-*

cenței (în literatura de specialitate — *Time Resolved Fluoroimmunoassay*, TR-FIA) se folosesc metale rare (de exemplu, europium, Eu, dintre lantanide), a căror viață a emisiei fluorescente este „lungă“ (100—1 000/µs) față de cea a fondului. Practic după realizarea interacțiunii antigen — anticorp, fazei solide i se măsoară fluorescența într-un fluorometru special, excitînd la 340 nm timp de 1 µs, cu repetare după 400 µs timp de 500 µs la 613 nm ; după un interval de 100 µs, ciclul este repetat de circa 1 000 de ori într-un interval de 1s. Deja, ingenioasa variantă a făcut din principiul TR-FIA unul de perspectivă, chiar dacă la ora actuală echipamentul necesar este deosebit de costisitor. Date prezentate la ultimul Congres de la Edmonton (1987) au demonstrat valoarea procedeului într-o serie de sisteme virale, precum hepatită virală B (Titti și colab.), gripa (Greene și colab.) sau infecțiile cu adenovirusuri 40 și 41 (Brown și colab.) ; în cazul acestora din urmă, de exemplu, TR-FIA rezolvă situația în cîteva ore față de zilele necesare încercărilor de hibridizare și chiar săptămînile ce se cer pentru izolare și serotipare convențională.

15.3.6.2. *Procedee imunoenzimatice (RIE)*

Procedeele (reacțiile) imunoenzimatice se bazează pe folosirea unui marker enzimatic fixat pe un reactant care participă într-un fel sau altul la o reacție imunologică, astfel încît prezența sa permite stabilirea interacțiunii antigen — anticorp, care altfel nu ar putea fi evidențiată ; în cadrul lărgit astăzi al reactanților care pot fi cuplați cu enzime în realizarea RIE se cuprind antigene și haptene, anticorpi completi sau numai fragmente, proteina A stafilococică etc.

Apărute la începutul deceniului '70, RIE au cunoscut o dezvoltare, diversificare și aplicare în diferite domenii, în mod deosebit în virusologie, încît astăzi reprezintă una din perspectivele menite să aducă diagnosticul infecțiilor virale la valoarea necesară practicii eficiente în combaterea lor (Voller, 1976).

În literatura de specialitate RIE se întîlnesc sub variate denumiri*, cu înțeles mai larg sau mai restrîns, care uneori încearcă să indice mai direct anumite caracteristici ale uneia sau alteia din variante ; cele mai multe indică legarea enzimei și/sau faptul că reacția se desfășoară pe un suport — faza solidă — care permite desfășurarea etapelor ce constituie întreaga metodologie, cu interacțiunea succesivă a reactanților și spălările menite să elimine excesul acestora. În mod deosebit, sigla ELISA, rezultată din denumirea considerată princeps din 1971, pe care Engvall și Perlmann au dat-o tehnicii lor — *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* — și care este considerată că se referă la titrarea anticorpilor, a căpătat astăzi în literatura curentă un sens mult mai larg, aproape atotcuprinzător, indiferent de reactantul imunologic pe care îl evidențiază.

---

* În literatură se acordă variate denumiri acestui tip de reacții : *enzyme immunoassay, enzymatic immunoassay, immunoenzymatic assay, enzyme-linked immunoassay, enzyme-labeled immunoassay, enzyme-coupled immunoassay, solide phase enzyme immunoassay, enzyme-linked sandwich immunoassay, titrage immunoenzymatique, titrage en phase solide, titrage immunoenzymatique spécifique*, ș.a.m.d.

Dat fiind extinderea prezentă, ca și perspectivele de a realiza în virusologie o nouă etapă calitativ superioară pentru diagnostic, apar necesare cîteva date privind RIE.

RIE se împart în reacții de tip omogen (în fază omogenă) și reacții de tip heterogen (în fază heterogenă). Reacțiile în fază omogenă (Delamonica, 1977), cunoscute în literatura de specialitate ca EMIT (respectiv, *Enzyme Multiplied Immunoassay Technique),* se bazează pe faptul că tratarea cu anticorpi a unei haptene care poartă o enzimă duce la dispariția activității acesteia din urmă ; atunci cînd haptena marcată se găsește în competiție cu un preparat antigenic similar de care se leagă o parte din anticorpi, în mediul de reacție se evidențiază mai multă activitate enzimatică în comparație cu proba de control în care toată enzima a fost blocată. Tot de tip omogen sînt variantele în care se folosesc doi anticorpi monoclonali pentru epitopi învecinați marcați cu anumite enzime, astfel încît una produce substratul pentru cealaltă (de exemplu, glucozoxidaza și peroxidaza). Varianta EMIT nu are încă aplicare în domeniul virusologiei, în schimb, pentru diagnosticul infecțiilor virale, există nenumărate variante de tip neomogen cu separare ; în majoritatea variantelor actuale unul din reactanți îmbracă un suport — faza solidă —, realizînd un *immunosorbent* la nivelul căruia se desfășoară etapele ulterioare ale interacțiunilor specifice ; în ultimă instanță este implicat un reactant care poartă enzima a cărei reținere la nivelul imunosorbentului poate fi apreciată calitativ și cantitativ.

Ca și în RIA, unele variante de RIE se desfășoară în soluție și separările necesare folosesc ultracentrifugarea, precipitarea etc.

Indiferent de tipul de RIE — omogen sau heterogen — prezența enzimei se dezvăluie cu ajutorul unui substrat specific acesteia ; modificarea substratului duce la o reacție de culoare a cărei intensitate se apreciază de obicei cu un instrument adecvat — important pentru determinări cantitative —, dar care poate fi apreciată și cu ochiul liber, fără ca sensibilitatea investigației să scadă prea mult.

În principiu, RIE se desfășoară fie prin competiție — variante mai rar folosite astăzi —, fie fără competiție (fig. 15-3).

În primul caz, există o variantă în care procesul se desfășoară în mod similar celui întîlnit în RIA : antigenul cu enzimă se află în competiție cu antigenul presupus în materialul examinat, în prezența anticorpilor corespunzători ; antigenul-enzimă rămas nefixat se separă de cel legat de către anticorpi prin diferite modalități.

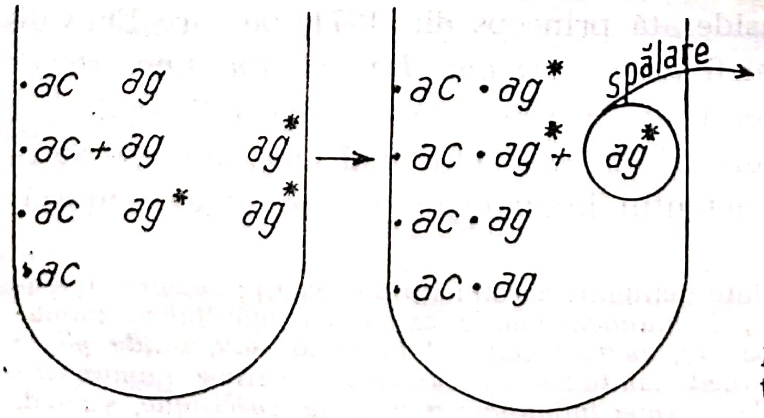


Fig. 15-3 — Determinare de antigen prin competiție (după Voller și colab.).

Tot prin competiție se pot face determinări de antigen dar în prezența unui anticorp cu enzimă, care este blocat în prealabil de către materialul examinat și nu se mai poate fixa pe faza solidă care poartă antigen standard — varianta cunoscută sub denumirea de CELIA *(Competitive Enzyme-Linked Immunoassay)*.

Astăzi, variantele de tip heterogen, destinate identificării antigenelor sau anticorpilor, sînt de obicei fără competiție.

Principala variantă pentru determinarea antigenelor se bazează — ca și la RIA — pe captura antigenului (ag ?) de către anticorpul (ac) care îmbracă faza solidă (fs) și apoi recunoașterea sa cu un anticorp-enzimă (ac*) (1) sau — indirect — cu un anticorp (ac) și o antiglobulină (a*ac) (2). În RIE, un antigen mai poate fi detectat — direct sau indirect — folosind pentru îmbrăcare chiar materialul care se examinează (3) (de exemplu, suspensie de fecale pentru antigen HBs), dar aceasta înseamnă că laboratorul efectuează operațiuni a căror standardizare nu este asigurată :

$$\text{fs. ac}+\text{ag ?} \rightarrow \text{fs. ac. ag ?}+\text{ac}^* \rightarrow \text{fs. ac. ag ?. ac}^* \qquad (1)$$

$$\rightarrow \text{fs. ac. ag ?}+\text{ac} \rightarrow \text{fs. ac. ag ?. ac}+\text{ a}^*\text{ ac} \qquad (2)$$

$$\rightarrow \text{fs. ac. ag ?. ac. a}^*\text{ ac}$$

$$\text{fs}+\text{ag ?} \rightarrow \text{fs. ag ?}+\text{ac}^* \rightarrow \text{fs. ag ?. ac}^* \qquad (3)$$

În aceste variante (sandwich sau, respectiv, dublu sandwich), antigenul investigat trebuie să fie dotat cu cel puțin doi determinanți specifici ; nivelul specificității reacției ține și de faptul dacă se folosesc anticorpi față de virus pentru captură și respectiv pentru recunoaștere de la aceeași sau de la două specii diferite (în varianta indirectă absolut necesar).

Pentru detectarea anticorpilor, principiul procedeului constă în capturarea lor din serul examinat cu ajutorul antigenului cu care este îmbrăcată faza solidă ; recunoașterea anticorpului se face cu ajutorul unei antiglobuline purtătoare de enzimă sau eventual de conjugatul proteină A — enzimă. În același mod se stabilesc clasele de imunoglobuline cărora le aparțin anticorpii, recunoașterea lor după reținerea pe antigen necesitînd de data aceasta conjugate antiglobulină specifică — enzimă ; adesea, detectarea anticorpilor de tip IgM este viciată în acest sistem atît prin prezența unui exces de anticorpi de tip IgG (reacții fals negative), cît și prin prezența factorului reumatoid (reacții fals pozitive). Remedierea acestor situații necesită prelucrări prealabile (de exemplu, adsorbția serurilor pe IgG agregat sau cu stafilococ Cowan I îmbrăcat sau nu cu IgG), dar mai ales înlocuind schema de reacție cu una zisă „de captură". În această variantă, faza solidă se îmbracă cu un ser anti- μ, al cărui rost este de a reține din ser fracțiunea IgM conținînd și anticorpii corespunzători ; recunoașterea acestora se face cu ajutorul antigenului, direct (dacă acesta poartă enzimă) sau indirect (antigenul fixat pe faza solidă fiind recunoscut după modelul obișnuit cu anticorpi marcați) :

$$\text{fs. anti- }\mu\text{. ac (gM). ag}^*$$

$$\text{fs. anti- }\mu\text{. ac (IgM). ag. ac}^*$$

$$\text{fs. anti- }\mu\text{. ac (IgM). ag ac. PA}^*$$

Indiferent de schema în care se succedă diferitele interacțiuni cu caracter imunologic (pseudoimunologic în cazul folosirii proteinei A), în ultimă instanță enzima reținută prin sistemul de punți intermediare cu suportul fazei solide trebuie evidențiată, în probe calitative fiind suficientă numai stabilirea prezenței sale, în cele cantitative apreciindu-se cantitatea prezentă.

Majoritatea procedeelor imunoenzimatice folosite astăzi se încadrează în cele caracterizate prin amplificarea activității, în care limita teoretică a moleculelor care pot fi detectate este de 1 (de exemplu, s-a reușit să se măsoare activitatea moleculelor izolate de β-galactozidază), dar în practică această limită este încă la nivelul 10^4 molecule. Procedeele caracterizate prin modularea activității ar fi dotate cu o mai mare specificitate, dar una suficient de bună este realizată prin variantele sandwich, folosind două seruri imune diferite sau anticorpi monoclonali (Kurstak, 1985).

În procedeele imunoenzimatice s-au folosit diferite enzime ; în literatură cel mai frecvent sînt întîlnite peroxidaza și fosfataza alcalină, uneori însă apare și glucozoxidaza sau β-galactozidaza, acetilcolinesteraza, glucoamilaza, lactoperoxidaza, malatdehidrogenaza, glucozo-6-fosfatdehidrogenaza, lizozimul.

Alegerea enzimelor ține seama de o mare varietate de factori (gradul de puritate, stabilitatea în timp și cu ocazia cuplării, simplitatea evidențierii sale), printre care și prezența în materialele examinate a enzimei sau a unor inhibitori ai acesteia.

Peroxidaza, una din cele mai utilizate enzime, datorează aceasta marii stabilități a conjugatelor și posibilității de revelare, chiar pentru examenul cu ochiul liber, fiind și mai ieftină decît fosfataza alcalină, care este și mai puțin stabilă. În schimb, substratul specific al primei enzime constă în substanțe instabile și uneori periculoase (unele au efect cancerigen) (tabelul 15-XVI).

TABELUL 15-XVI

Substraturi ale celor mai folosite enzime în RIE

Enzima	Substrat
Fosfataza alcalină	— paranitrofenilfosfat — 4-metilumbeliferilfosfat
Peroxidază	— acid 5-aminosalicilic — ort.fenilendiamină (cea mai mare sensibilitate) — ortodianisidină (insolubil, carcinogen) — ortotoluidină (produs colorat instabil) — diaminobenzidină (produse insolubile) — ABTS (acid 2,2′-azino-di-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic) (pare cel mai bun ca solubilitate, stabilitate și sensibilitate) — 4-cloro-1-naftol (pentru *immunoblotting*)
Glucozoxidază	— glucoză în prezența ABTS
β-galactozidază	— o-nitrofenil-β-galactopiranozid

În efectuarea RIE, în etapa finală se aduce enzima reținută pe faza solidă în situația de-a acționa asupra substratului, această acțiune fiind apoi stopată după un interval standardizat, încît rezultatele să poată fi comparate (stoparea obținîndu-se cu ajutorul unei baze sau acid puternic cu efect asupra enzimei).

Aprecierea spectrofotometrică a modificării substratului stabilește proporția de enzimă reținută în condiții anume.

În ultima vreme s-au introdus ca substrat în RIE substanțe care, sub acțiunea enzimei, eliberează produse fluorescente, măsurătorile efectuate cu instrumente adecvate oferind date de o mai mare sensibilitate (de exemplu, pentru fosfataza alcalină — metilumbeliferilfosfat — cu care Kato, în 1977, detectează 0,3 fM de IgM umană).

Aplicarea practică a acestor principii ale RIE impune cunoașterea unor factori anumiți, printre care :

— *suportul folosit* poate fi reprezentat de diferite materiale pe care reactantul imunologic poate fi fixat direct (prin simplă adsorbție) sau printr-un proces prealabil de activare ce creează legături covalente între suport și reactant.

Rareori s-a încercat sticla ca suport, dar numai cu tratamente deosebite ; menționăm (doar din considerente istorice) particulele de celuloză sau gelul de agaroză activate prin cianbromid.

Materialele plastice — polimerii —, actualmente atît de prezenți în toate domeniile, au dovedit că pot adsorbi diferite substanțe, în special de natură proteică (precum antigene, haptene, anticorpi ca și, important pentru imaginarea unor variante deosebite, proteina A stafilococică etc.) ; astăzi, materialele plastice reprezintă aproape în exclusivitate suportul utilizat în RIE. Deși într-o vreme s-a considerat că polistirenul este cel mai bun, astăzi se știe că oricare polimer poate fi folosit și chiar s-a afirmat că polivinilul are calități superioare. În orice caz, se impune control adecvat pentru fiecare sistem viral și chiar pentru variate modalități de obținere a reactanților (de exemplu, în funcție de modul de preparare a antigenului viral ca și de felul anticorpilor — specie de proveniență, clase de imunoglobuline etc.).

Chiar și în cazul materialelor plastice s-au descris diferite modalități de tratare spre a favoriza îmbrăcarea cu reactanți imunologici (de exemplu, cu poliL-lizină sau glutaraldehidă). În realitate nu se știe exact natura interacțiunii material plastic — reactant imunologic, dar proprietățile hidrofobe ale suprafeței sînt absolut necesare și de altfel trebuie anihilate după îmbrăcare, spre a se evita absorbții nespecifice ulterioare.

Numeroase forme ale suportului plastic au fost imaginate și folosite : eprubete de diferite dimensiuni, plăci cu godeuri, baghete, bile etc. Eprubeta pare mai indicată pentru cuantificare (Saunders, 1979), dar în prezent cea mai largă utilizare o au plăcile cu godeuri, mai ales cele concepute pentru volume mici de reactanți ; microplăcile cu 96 de godeuri sînt îndeosebi recomandate și reprezintă forma comercială cea mai răspîndită.

Avantajul microplăcilor cu 96 de godeuri — pe lîngă consumul redus de reactanți și manipularea ușoară — ține și de posibilitatea de a investiga mai multe probe în același timp, mai ales că pentru citirea rezultatelor s-au creat deja instrumente adecvate care pot cuprinde întreaga placă pentru manipulare și măsurare; microplăcile au avantajul — reamintim — de a putea fi folosite și în RIA, fiecare godeu putînd fi tăiat din placă și radioactivitatea măsurată separat.

Ca baghete sau lame, reamintim de asemenea că suportul este adecvat și pentru FIA.

Bilele simple par avantajoase pentru îndeplinirea operațiilor succesive, cînd ele se trec dintr-un godeu într-altul; totuși, această modalitate pare mai greoaie atunci cînd se folosesc în investigarea unor probe numeroase și mai ales cînd pentru fiecare probă se cercetează diferite sisteme imunologice. Mai avantajoase s-au dovedit bilele în care se include un miez cu proprietăți magnetice; pentru acestea s-au creat sisteme de transfer magnetic, ușurîndu-se astfel manipularea.

Membranele de nitroceluloză par din ce în ce mai utilizate, fiind deosebit de avantajoase atît prin performanțe, cît și prin posibilitățile de manipulare: ca discuri cu diametre foarte reduse pot fi prelucrate chiar în godeurile unor microplăci sau pot fi adaptate unor dispozitive de filtrare adecvate. În același fel s-au experimentat și filtre din fibre de sticlă.

— Așa-numita *„îmbrăcare a fazei solide“* pune multiple probleme pentru fiecare tip de reactant.

În cazul suporturilor de natură plastică, fixarea diferitelor molecule se face de obicei prin adsorbție simplă, prin intermediul forțelor electrostatice, dar procesul nu este cunoscut în amănunt; în plus, calitatea unuia și aceluiași material plastic diferă chiar în cadrul aceluiași lot și chiar pentru godeuri din aceeași placă (de exemplu, se recomandă să nu se folosească rîndurile laterale de godeuri). Tratarea prealabilă a godeurilor prin nitratare sau cu glutaraldehidă a fost recomandată ca o modalitate de ameliorare și uniformizare a proprietăților eprubetelor sau godeurilor; de altfel, ca și tratarea cu poliL-lizină, diferite lectine ar părea că realizează posibilități de legare covalentă a reactantului de fază solidă; Lin (1980) îmbracă discuri de material plastic prevăzute cu grupuri izotiocianat la suprafață.

Cel mai frecvent, pentru îmbrăcarea fazei solide, reactanții imunologici se folosesc diluați într-un tampon carbonat la pH 9,6, contactul cu suportul durînd de pe o zi pe alta la +4°C; uneori, această modalitate dă rezultate slabe (de exemplu, în cazul coronavirusurilor, îmbrăcarea rezultată este slabă și, frecvent, se realizează un fond nespecific de colorare); s-a constatat uneori că un tampon fosfat salin cu incubare de cîteva ore, la 37°C, poate fi cel puțin la fel de eficient, uneori chiar cu rezultate superioare; în orice caz, pare indicat ca pentru fiecare sistem să se facă determinări prealabile, căci pentru unele parvovirusuri s-a descris o îmbrăcare satisfăcătoare în 20 de minute, la 37°C, iar pentru IgG, optimum este o adsorbție de o oră, la 37°C. De reținut că fiecărui anticorp monoclonal trebuie să i se determine pH-ul optim pentru îmbrăcarea suportului.

Considerîndu-se că adsorbția pasivă la materialul plastic este variabilă, pentru ameliorarea procesului de îmbrăcare s-a folosit ca punte albumina bovină, iar după uscarea și fixarea ei pe faza solidă (de exemplu, alcool acetonic sau glutaraldehidă) carbodimida pentru legarea antigenului (Skurrie, 1983).

— *Antigenele virale* cu care se îmbracă suportul reprezintă, ca și în cazul RIA, lichide embrionare sau din culturi celulare infectate, ca atare sau după concentrare și purificare, ori extracte de celule, țesuturi, organe. Uneori, virusurile intacte din suspensiile astfel pregătite nu reușesc să sensibilizeze suportul și trebuie parțial denaturate, eventuala creștere a sensibilității RIE ținînd probabil de mărimea interacțiunii hidrofobe dintre plastic și proteină (de exemplu, Inouye, în 1983, tratează rotavirusuri cu agenți chaotropici, precum NaSCN sau guanidin-HCl) ; în cazul antigenelor lipoproteice de înveliș ale unor virusuri, prezența dezoxicolatului de sodiu este adesea absolut necesară.

În cazul anticorpilor, s-a preconizat o parțială denaturare la nivelul Fc al IgG în tampon glicocol, pentru o mai bună adsorbție pe plastic.

Pe membrana de nitroceluloză reactantul se depune sub formă unei picături de ordinul µL și se usucă, eventual suportul fiind activat înainte cu cianbromid sau, uneori, cu o fixare ulterioară prin glutaraldehidă.

În cazul reactanților în soluție trebuie să se țină seama și de eventuale neajunsuri întîlnite în pregătirea suporturilor îmbrăcate pentru RIE.

Suporturile sintetice necesită pentru îmbrăcare un volum relativ important de reactant, variază în aviditate pentru diferite antigene, dintre care unele pot fi desfăcute de pe suport în cursul etapelor ulterioare ale RIE, avînd o comportare inegală față de antigene în funcție de loturi etc. Aceste situații sugerează o preparare centralizată bine controlată, prin care să se asigure rezultate comparabile indiferent de laboratorul în care se obțin.

Membranele nitrocelulozice cîștigă din ce în ce mai mult favoarea specialiștilor, deoarece necesită pentru îmbrăcare un volum foarte redus de reactant, fixînd aproape în totalitate antigenul depus ; sensibilitatea unei astfel de probe este superioară, chiar dacă de cele mai mule ori rezultatele au o interpretare vizuală, dar perspectivele pentru dispozitive de citire automată sînt deja semnalate.

Uneori, îmbrăcarea suportului folosește celule infectate cu virus (lamelele pe care acestea au cultivat sau suspensie de celule recoltate din cultură). După 48 de ore, necesare pentru aderare și uscarea lor pe fundul eprubetei sau al godeului din placă, se fixează cu glutaraldehidă 0,05% timp de 60 de secunde (Cox, 1984). Unele variante ingenioase lasă celulele să se depună pe filtre de nitroceluloză sau din fibre de sticlă (Richman, 1981) adaptate la dispozitive care, prin posibilitatea filtrării, facilitează toate etapele ulterioare. În astfel de variante s-a ajuns chiar la posibilitatea ca același preparat să poată fi dublu folosit : dacă substratul peroxidazei este transformat într-un produs insolubil, antigenul viral este vizualizat microscopic, iar, dacă se folosește și un substrat din care rezultă un produs colorat solubil se permite aprecierea fotometrică cantitativă a rezultatului.

— După îmbrăcarea suportului, de cele mai multe ori suprafețele rămase libere sînt blocate prin tratarea cu albumină bovină, ser normal sau gelatină. Indiferent dacă această operație se face sau nu, suportul se spală cu un tampon care conține Tween-20 (0,05—0,2%) cu rolul de a modifica proprietățile materialului hidrofob, astfel încît să nu se mai adsoarbă nespecific material din reactanții ce participă la reacție în fazele ulterioare.

În privința păstrării fazelor solide astfel preparate, în literatură se întîlnesc cele mai variate modalități la care s-a apelat ; în orice caz se sugerează, uneori, că ar exista diferențieri în funcție de antigenul sau anticorpii folosiți. În cazul îmbrăcării cu anticorpi, uneori a fost indicată o păstrare de maximum 12 ore, dar majoritatea datelor demonstrează posibilitatea păstrării la congelator și chiar la +4°C, timp de mai multe luni, mai ales pentru trusele furnizate comercial în ambalaje adecvate ; pentru trusele pregătite izolat, în fiecare laborator, păstrarea s-a efectuat uneori chiar sub fixator (de exemplu, alcool metilic), în momentul folosirii spălîndu-se pentru prima dată. În cazul membranelor nitrocelulozice, după îmbrăcarea descrisă anterior, se face de asemenea o blocare cu albumină bovină 3%.

— Etapele ulterioare constau într-o succesiune de tratări ale fazei solide cu diferiți reactanți conform schemei fiecărei variante, între ele efectuîndu-se spălări suficient de largi pentru a elimina de fiecare dată reactantul nereacționat sau eventual reținut — destul de slab spre a fi îndepărtat —, nespecific.

De obicei, spălările se fac cu soluții tampon, cel mai frecvent fiind vorba de cel fosfat, conținînd Tween-20 și chiar albumină bovină.

Practic, spălarea se face cu dispozitive speciale de umplere și absorbție ; discurile nitrocelulozice se spală, fiind menținute în godeuri sau prin trecere succesivă cu pensa prin soluțiile respective.

Bilele se spală de asemenea în eprubete sau, mai greu, cîte una, transferîndu-se cu pensa ; cele cu miez magnetic beneficiază astăzi de dispozitive adecvate.

În privința serurilor folosite în RIE, spre a se asigura o înaltă specificitate în cazul unor variante în care se succed mai mulți anticorpi în etape diferite, se impune folosirea unor seruri cu aceleași specificități virale, dar provenind de la specii animale diferite.

De Jong (1983) preconizează formarea prealabilă a unui complex din anticorpi purificați și antiglobulina corespunzătoare deja conjugate cu enzimă, situație în care și serul care îmbracă suportul poate să provină de la aceeași specie cu cel complexat ; procedeul apare indicat, mai ales în cazul cînd nu se dispune decît de un singur anticorp monoclonal față de respectivul antigen viral.

— Conjugatele reprezintă antigene virale, anticorpi față de aceste antigene, antiglobuline sau proteina A stafilococică ; anticorpii sînt în diferite grade de purificare (de exemplu, ser integral, preparate globulinice obținute prin precipitări saline sau cromatografiere, anticorpi purificați pe coloane de afinitate, anticorpi monoclonali).

Conjugarea pune multiple probleme și în primul rînd alegerea enzimei în așa fel încît să corespundă cel mai bine variantei tehnice, ca și sistemului viral investigat. Criterii ca : nivelul activității enzimei (număr de molecule-substrat transformate de un situs enzimatic într-un anumit interval de timp), puritatea enzimei sau sensibilitatea cu care se detectează activitatea sa sînt importante pentru alegerea ei ; pentru activitatea laboratorului de virusologie s-au impus peroxidaza și fosfataza alcalină. Detectarea activității enzimei participante la reacția antigen — anticorp se face de obicei prin modificări de culoare ale unui substrat cromogenic, dar substraturile fluorogenice sau radioactive au o sensibilitate mult mai mare.

Cuplarea enzimelor la antigene sau anticorp se realizează prin metode diferite, dar mai frecvent utilizate sînt cele în care glutaraldehida participă ca agent de cuplare (variantele diferă după cum se efectuează în două sau numai o singură etapă), după principiul lui Avrameas și Ternick (1969), sau metoda cu periodat (Nakane și Kawaoi, 1974). Eficiența conjugării se referă la proporția reținerii activității enzimatice ca și a celei imunologice, efectele conjugării fiind în funcție de enzimă și de metoda de cuplare, ca și de purificarea consecutivă spre a elimina enzima rămasă liberă și reactantul nemarcat, elemente care duc de obicei la reacții nespecifice sau la un fond crescut pentru controalele introduse în reacție. Pe lîngă proprietățile imunologice și cele enzimatice ale conjugatului, stabilitatea sa influențează alegerea pentru nevoile laboratorului (de obicei conjugatele rămîn eficiente peste un an de păstrare la frigider, cele cu fosfatază alcalină s-au menținut chiar și la temperatura camerei, în acest interval).

— În reacțiile care folosesc conjugate enzimatice, ca urmare a activității asupra unor substraturi specifice, apar compuși colorați a căror intensitate este proporțională cu cantitatea lor. Aprecierea rezultatului se poate face cu ochiul liber, fără ca sensibilitatea probei să fie diminuată prea mult (de exemplu 1 μg față de 0,1 μg).

Reacția enzimă — substrat se dezvoltă liniar și trebuie oprită pentru citirea la 10—60 de minute iar citirea trebuie făcută într-un anumit interval.

Exprimarea rezultatelor a căpătat diferite modalități. Cel mai simplu și ușor mod de exprimare constă în raportarea absorbanței probei la cea a controlului, față de care trebuie să fie mai mare cu un anumit factor (de obicei 1,5—2), cu condiția ca absorbanța controlului să fie constantă. Citirea rezultatului la spectrofotometru se face pe o lungime de undă caracteristică fiecărui substrat, conform spectrului de absorbție propriu.

Aprecierile cantitative utilizează, de asemenea, diferite modalități, dintre care reținem fie efectuarea diluțiilor pînă la cea mai mare care mai are o absorbanță diferită semnificativ de cea a controlului, fie pe o singură diluție raportată la control.

— În privința duratei etapelor, indiferent de tipul de tehnică folosită (directă, indirectă, sandwich etc.), pentru decelarea de antigene sau anticorpi, inițial s-au preconizat cîteva ore pentru fiecare (chiar pînă la 18 ore), astfel încît o probă era rezolvată în cel puțin 24 de ore. Astăzi, în majoritatea variantelor preconizate se indică etape de 1—2 ore. Saunders (1979) și Yolken (1981) ajung la concluzia că, în RIE, chiar etape de cîte 10 minute ar fi suficiente și demonstrează că sensibilitatea unui procedeu total de o oră nu este cu mult mai mică decît a unuia care durează mai multe ore.

Aplicații ale RIE în virusologie. Se poate considera că nu există sistem viral în care să nu fi fost abordat diagnosticul prin RIE ; pentru multe din aceste sisteme virale, importante din punct de vedere practic, au fost create truse adecvate, care permit efectuarea diagnosticului la nivelul laboratoarelor de virusologie cu o dotare medie. Chiar și în domeniul infecției cu HIV există în prezent deja mai multe tipuri de truse, diagnosticul bazîndu-se în special pe detectarea anticorpilor corespunzători.

Chiar dacă dintre porcedeele imunologice de diagnostic se consideră că RIA este mai sensibilă, astăzi se evidențiază anumite opțiuni, preferința mergînd către RIE (ELISA) datorită unor condiții deja amintite (aparatură mult mai simplă, la nevoie rezultatul putînd fi apreciat cu ochiul liber ; preparatele au o valabilitate mult mai mare decît cea legată de perioada de înjumătățire a izotopului, fără pericolul legat de proprietățile radiante ale acestora).

În primul rînd RIE permit să se detecteze antigenele virale direct în produsele provenind de la bolnavi, chiar dacă virusurile nu pot fi cultivate. Această detectare face ca diagnosticul să se obțină mult mai rapid decît atunci cînd se desfășoară metodologia clasică de izolare și identificare ; chiar pe parcursul acesteia din urmă RIE poate identifica și tipiza izolatele într-un interval redus și fără prelucrările complicate obișnuite (de exemplu, cele din reacția de neutralizare).

RIE (ELISA) asigură identificarea și cuantificarea anticorpilor ; aceasta din urmă — avînd la dispoziție o curbă-etalon construită cu un ser cunoscut — putîndu-se realiza și numai cu o singură diluție de ser. ELISA a fost folosită în forma ei standard pentru precizarea naturii anticorpilor (clase de imunoglobuline), dar neajunsurile acesteia (de exemplu, interferența cu anticorpi IgG care ducea la reacții fals negative atunci cînd se investigau cei de tip IgM, ca și la reacții fals pozitive în cazul serurilor conținînd concomitent și factor reumatoid) au determinat imaginarea unor variante de captură a IgM și apoi precizarea funcției anticorp în cadrul său. Reamintim că în această variantă de captură, prezența antigenului reținut de anticorpi IgM capturați se poate stabili prin modalități curent utilizate în laborator : hemadsorbție de hematii pentru virusuri hemaglutinante sau, și mai direct, cu latex sensibilizat cu antigen.

Practica a beneficiat de descoperirea proteinei A care, marcată cu enzimă, este în măsură să înlocuiască al doilea anticorp (antiglobulina), cu un plus de specificitate datorită absorbanței de fond (control) mult mai reduse ; pe de altă parte, reactantul este mult mai ieftin.

În unele variante ale RIE intervine și complementul, aducînd un plus de sensibilitate (COMPELISA) (Hincliffe, 1983).

În fine, folosirea anticorpilor monoclonali, pe lîngă faptul că impune anumite condiții de desfășurare a RIE, face ca discriminările antigenice să fie mult mai fine și mai precise (Frange, 1985 ; Dennehy, 1988).

În exemplificarea celor de mai sus apar date numeroase. Astfel, în cazul adenovirusurilor, la o cantitate foarte mică de virus inoculat în culturi de celule (de exemplu, aproximativ 1,5 log $DICT_{50}$) RIE este pozitivă mai devreme decît apariția ECP (de exemplu, la 2 zile ELISA prezintă 62% pozitivitate față de ECP — 0, iar la 4 zile — 76% și respectiv numai 47%).

În cazul detectării de anticorpi în ansamblu, ELISA dovedește o mai mare proporție de seruri pozitive decît procedeele obișnuite și, chiar dacă există o corelare liniară a titrurilor, acestea sînt mai ridicate în RIE. De asemenea, se consideră că numai ELISA poate tria indivizii cu adevărat negativi față de o anumită infecție : Moser, în 1981, constată că numai ELISA răspunde în paralel cu stimularea limfocitară în cazul infecției herpetice, spre deosebire de RFC sau reacția de neutralizare.

Varianta EIB *(Electroimmunoblot)* sau *Western blot* (WB) este astăzi procedeul de verificare a specificității altor reacții (Talbot, 1984 ; Gallo, 1986 ; Blomberg și Klasse, 1988 ; Hofbauer, 1988).

RIE are astfel un loc aparte în diagnosticul infecțiilor fie prin detectarea antigenului viral, fie prin imunoserologie.

Astăzi laboratoarele folosesc pe scară din ce în ce mai largă RIE în diagnosticul infecțiilor virale și tind să renunțe la unele procedee clasice ; literatura de specialitate abundă în indicații bibliografice care desfid orice încercare de a face o prezentare exhaustivă.

RIE sînt simple, sensibile și ieftine, de mare accesibilitate și pot fi folosite atît pentru investigații în masă, beneficiind de aportul miniaturizării și automatizării, cît și pentru probe individuale, pentru care — așa cum am arătat — există deja variante procedurale adecvate.

15.3.6.3. *Procedee radioimunologice (RIA)*

RIA poate fi considerată încă cea mai sensibilă metodă pentru identificarea rapidă a antigenelor virale și a anticorpilor corespunzători.

Așa cum a fost introdus de către Yallow și Berson (1961), termenul RIA s-a adresat procedeului de identificare a antigenelor în soluție, prin competiție cu preparatul antigenic marcat cu izotop radioactiv ; în cazul anticorpilor purtînd markerul radioactiv s-a preferat termenul — încă folosit — de IRMA (procedeu imunoradiometric).

Astăzi, într-un sens mai larg, RIA reprezintă principiul general de identificare sau cuantificare a antigenelor și anticorpilor prin determinarea componentului radiomarcat înglobat într-un complex imunochimic (Overby și Mushawar, 1977). Practic, procedeele de determinare radioimunologică RIA, numeroase și variate, constau în folosirea antigenului sau a anticorpilor radiomarcați, în soluții sau în fază solidă, metodologia bazîndu-se sau nu pe competiția dintre factorul/reactantul investigat și cel cunoscut ; alegerea unui anumit procedeu se face în funcție de disponibilitatea și calitatea reactanților, în special de cea a anticorpilor.

Procedeele RIA s-au dovedit în măsură de a rezolva cele mai variate situații, foarte sensibile și de o mare specificitate, în măsură să asigure diagnosticul într-un interval incomparabil mai redus decît metodologia clasic folosită pentru diagnostic, în general, pentru cel al infecțiilor virale, în mod deosebit. De altfel, procedeele RIA s-au modificat în continuu și s-au adaptat noi perfecționări tehnice (de exemplu, pentru aparatura de dozare) și din alte domenii (de exemplu, de la tehnica inițială a lui Yallow și Berson s-a ajuns la efectuarea RIA aproape exclusiv în fază solidă ; stafilococul Cowan a facilitat separarea reactantului marcat legat de cel liber, etapă la care s-au imaginat facilități care reduc durata unei investigații la cîteva ore ; există posibilități de investigare simultană a numeroase probe folosind volume de reactant foarte reduse; ameliorarea reactanților radiomarcați se poate face fie prin înlocuirea anticorpilor cu proteina A, fie prin realizarea unor anticorpi cu calități deosebite, cum sînt cei monoclonali; s-a lărgit gama de radioizotopi pentru marcarea reactanților imunologici etc.).

Totuși, folosirea RIA în general, dar mai ales în laboratoare de diagnostic curent — printre care și cele adresate infecțiilor virale — apare grevată de cîteva neajunsuri, precum:

— viața limitată a reactantului marcat, dat fiind perioada de dezintegrare a radioizotopului (8 zile — ^{131}I, 60 de zile — ^{125}I etc.);

— aparatura necesară;

— pericolele legate de prezența sursei de iradiere în laborator, impunînd măsuri de protecție adecvate.

Toate acestea fac încă din RIA un procedeu costisitor, dar se înregistrează continuu progrese în măsură să faciliteze folosirea sa.

Variantele RIA se încadrează în exclusivitate în tipul de procedee neomogene care cer în cadrul desfășurării lor o etapă de separare a reactantului imunologic marcat rămas liber de cel inclus în complexul antigen — anticorp format, raportul legat/liber (*Bound/Free* în literatura de specialitate, B/F) exprimînd rezultatul investigației.

Indiferent de reactantul imunologic care poartă radionuclidul, procedeele RIA se efectuează fie în soluție (mediu lichid), fie folosind așa-numita fază solidă, respectiv reactantul imunologic (antigen sau anticorp) fixat pe un suport inert care permite manipulări adecvate în diferite etape.

În cadrul variantelor în soluție se întîlnesc:

— identificarea unui antigen viral prin competiția sa cu antigenul standard marcat cu radionuclid în prezența anticorpilor corespunzători; în consecință, în complexul antigen — anticorp format se va găsi mai puțin marker izotopic în comparație cu proba de control în care radioactivitatea se regăsește total în combinație cu anticorpul;

— identificarea anticorpilor virali prezenți într-un ser oarecare prin formarea unor complexe imune cu antigenul marcat folosit în reacție; prezența și gradul radioactivității regăsite în complexul imun separat de reactantul standard rămas liber constituie rezultatul reacției (fig. 15-4).

Reiese că, în aceste variante, momentul esențial îl constituie separarea reactantului marcat rămas liber de cel inclus în complexele imune; au fost preconizate diferite metode de separare, printre care menționăm cromatoelectroforeza (eficientă îndeosebi pentru antigene cu moleculă mică), absorbția antigenului liber de către diferite substanțe (cărbune, rășini schimbătoare de ioni), precipitarea complexelor imune (sulfat de amoniu, PEG 6 000, seruri antiglobulinice). În virusologie, în mod deosebit, precipitarea specifică a complexului imun cu ajutorul unei antiglobuline adresate speciei pe care s-au preparat anticorpii folosiți în detecție de antigen sau cu antiglobulină antiom, atunci cînd se efectuează diagnosticul serologic, a devenit metoda cea mai utilizată; tehnica apare destul de incomodă (durează mult, necesită centrifugi capabile a realiza 10 000 r.p.m., consumă reactiv biologic costisitor). Dintre metodele alternative pentru separare menționăm, în mod deosebit, utilizarea stafilococului Cowan I (SPA), a cărui proteină A leagă imunoglobulinele — libere

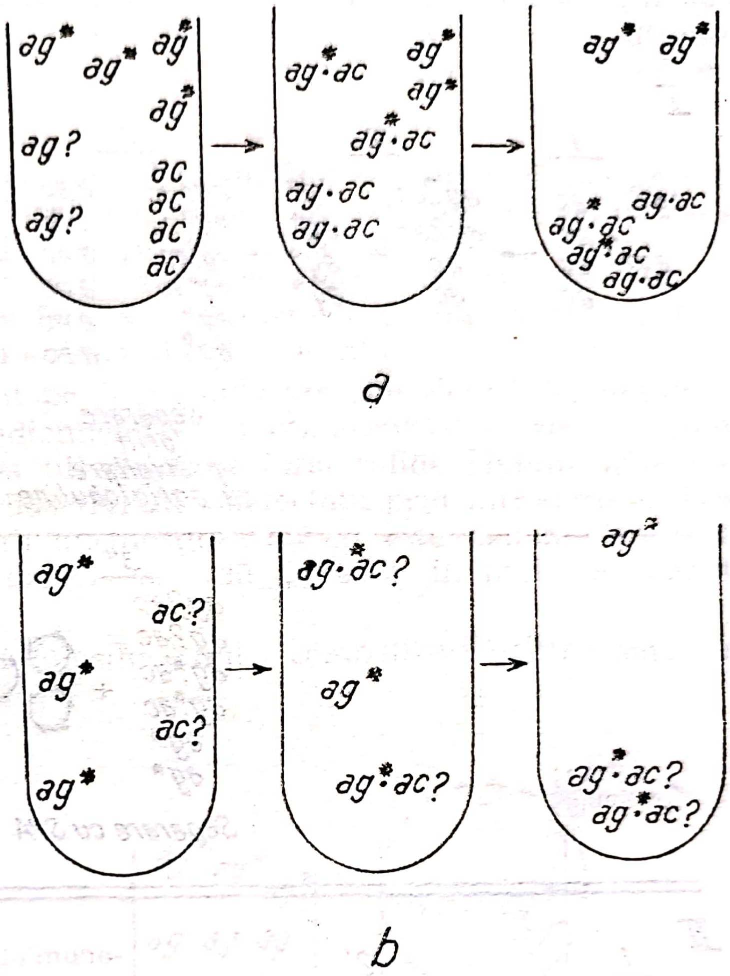


Fig. 15-4 — Investigații radioimunologice în soluție.
a — identificarea unui antigen ;
b — identificarea anticorpilor.

sau din complexul imun format cu antigenul radiomarcat — și le atrage în sediment printr-o scurtă folosire a unei centrifugi obișnuite (15—30 de minute la 2 500 r.p.m.) (fig. 15-5).

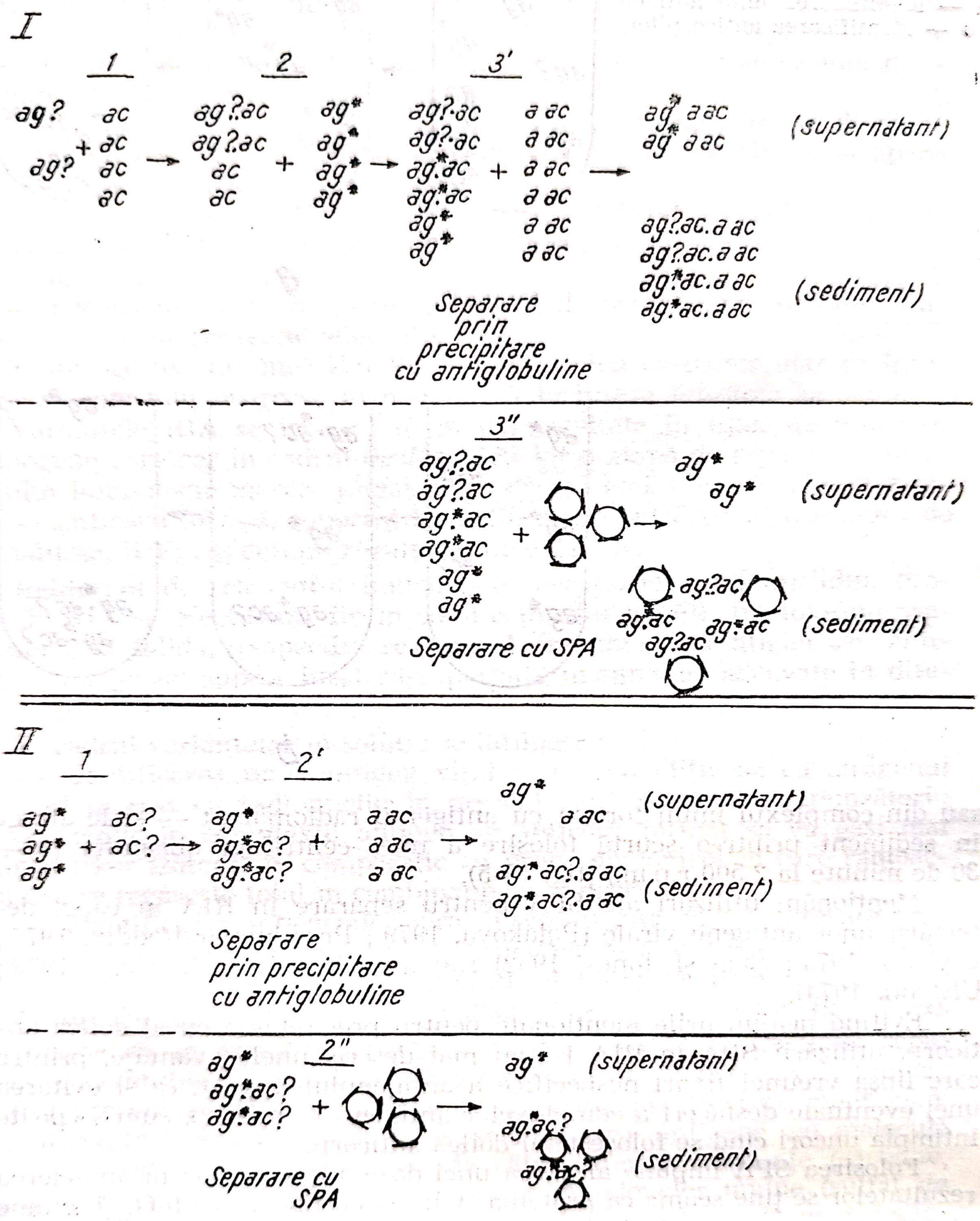
Menționăm utilizări ale SPA pentru separare în RIA în cazul detectării unor antigene virale (Polakova, 1979 ; Premkumar-Reddly, 1977 ; Ulstrup, 1974 ; Siag și Jones, 1982) sau a anticorpilor (Jahrling, 1978 ; Ulstrup, 1974).

Evitînd neajunsurile menționate pentru precipitarea cu al doilea anticorp, utilizării SPA în RIA i s-au mai descris unele avantaje, printre care lipsa vreunei fixări nespecifice a antigenului marcat, ca și evitarea unei eventuale desfaceri a complexelor antigen — anticorp, cum se poate întîmpla uneori cînd se folosește al doilea anticorp.

Folosirea SPA impune alegerea unei doze adecvate, iar în aprecierea rezultatelor se ține seama că proteina A leagă cu precădere IgG, și anume numai pe cea provenind de la anumite specii (om, iepure, cobai).

Investigațiile radioimunologice se efectuează astăzi pentru diagnosticul infecțiilor virale aproape în exclusivitate prin variante în fază solidă, datorită avantajelor tehnice pe care acestea le oferă laboratorului, în mod asemănător cu aplicațiile RIE.

În aceste variante, faza solidă — reprezentată de diferite suporturi (eprubete și bile, cel mai obișnuit), de obicei din material plastic, even-



I
1
2
3'
ag? ac
ag? + ac
ac
ac
ag?.ac
ag?.ac
ac
ac
ag*
ag*
ag*
ag*
ag?.ac
ag?.ac
ag*.ac
ag*.ac
ag*
ag*
a ac
a ac
a ac
a ac
a ac
a ac
ag* a ac
ag* a ac
(supernatant)
ag?.ac.a ac
ag?.ac.a ac
ag*ac.a ac
ag*ac.a ac
(sediment)
Separare prin precipitare cu antiglobuline
3''
ag?.ac
ag?.ac
ag*ac
ag*ac
ag*
ag*
ag*
ag*
(supernatant)
ag?ac
ag*ac
ag*ac
ag?ac
(sediment)
Separare cu SPA
II
1
2'
ag* ac?
ag* + ac?
ag*
ag*
ag*.ac?
ag*ac?
a ac
a ac
a ac
ag*
a ac
(supernatant)
ag*ac?.a ac
ag*ac?.a ac
(sediment)
Separare prin precipitare cu antiglobuline
2''
ag*
ag*ac?
ag*ac?
ag*
(supernatant)
ag*ac?
ag*ac?
(sediment)
Separare cu SPA

Fig. 15-5 — Separarea reactanţilor în cursul investigaţiilor radioimunologice. *I* — în cazul detectării de antigen ; *II* — în cazul detectării de anticorp ; *1, 2, 2', 2'' 3', 3''* — etape ; *ag ?* — antigen presupus în proba examinată ; *ac ?* — anticorp presupus în proba examinată ; *ag** — antigen marcat ; *a ac* — antiglobulină specifică pentru anticorpul de identificat (*ac ?*) sau pentru cel cu care se identifică (*ac*) ; *ac* — anticorp faţă de antigen, folosit la identificarea acestuia. O — particulă stafilococică ; ▬ — proteină A.

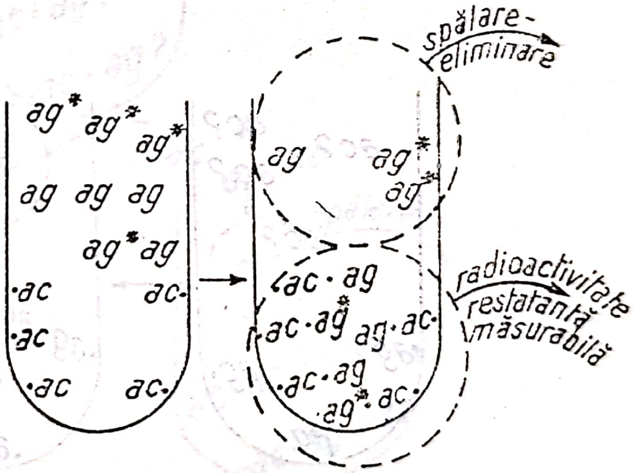
tual și din sticlă tratată în mod special — se îmbracă cu antigen viral sau cu anticorpi ; ca fază solidă s-au folosit și diferite membrane filtrante pe care s-a depus antigen viral. Uneori, antigenul viral a fost reprezentat chiar de celule infectate cu virus.

Dintre variantele tehnice ale determinărilor radioimunologice în fază solidă menționăm că, de obicei, ele nu au un caracter competitiv, deși această modalitate a fost descrisă (Catt și Treager, 1967) pentru identificare de antigen, ceea ce necesită stabilirea unei curbe standard din raportul radioactivității legate față de cea liberă în condițiuni stricte, folosindu-se doze cunoscute din antigenul corespunzător.

Practic, anticorpul fixat pe faza solidă are „de ales“ între antigenul standard — purtător de radionuclid — și cel eventual prezent în proba ce se examinează. Spălarea ulterioară a fazei solide elimină antigenul marcat rămas liber, iar radioactivitatea detectată prin introducerea fazei solide în aparat dă indicații diagnostice : cu cît este mai mică, cu atît mai mult antigen corespunzător se află prezent în proba examinată (fig. 15-6).

În mod similar au fost folosite tehnici competitive pentru detectare de anticorpi (fig. 15-7).

Fig. 15-6 — Determinări radioimunologice de antigene în fază solidă, prin competiție.


ag* ag* ag*
ag ag ag
ag* ag
·ac ac·
·ac
·ac ac·
spălare-eliminare
ag ag* ag*
ac · ag
ac·ag* ag·ac·
·ac·ag
ag*·ac·
radioactivitate restantă măsurabilă

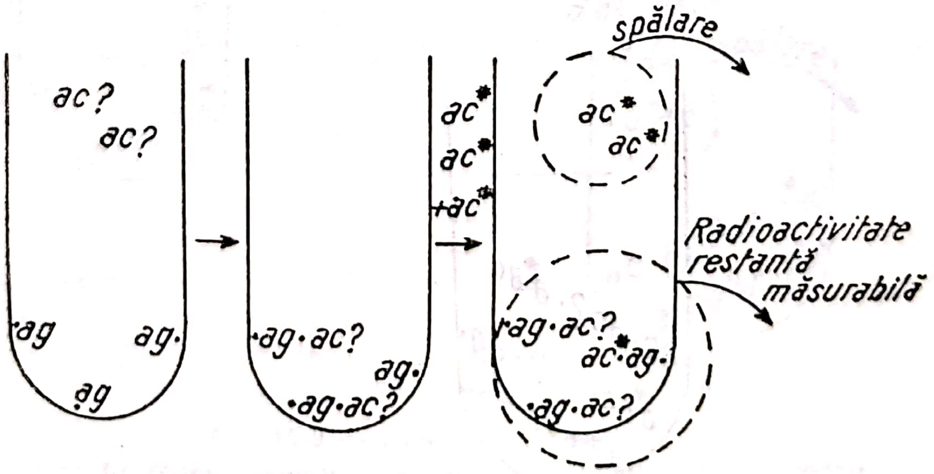

ac?
ac?
·ag ag·
ag
·ag·ac?
ag·
·ag·ac?
ac*
ac*
+ac*
spălare
ac*
ac*
Radioactivitate restantă măsurabilă
ag·ac?
ac*·ag·
·ag·ac?

Fig. 15-7 — Detectare de anticorp în fază solidă prin competiție.

De obicei, investigările radioimunologice în fază solidă, fără competiţie, indiferent dacă sînt destinate a detecta antigene sau anticorpi, folosesc ca reactant-indicator anticorp (fie antiviral, fie antiglobulinic) marcat cu izotop, deşi au fost uneori preconizate şi variante cu antigen radioactiv (de exemplu, truse pentru anticorpi anti-HBs de la Abbott Laboratories).

Iată unele scheme de reacţii :

— antigenul care îmbracă faza solidă reţine anticorpul seric, care la rîndul său este recunoscut de antiglobulina ce poartă radionuclidul (detectare de anticorpi) (fig. 15-8) ;

— antigenul care îmbracă faza solidă reţine anticorpul seric, iar acesta la rîndul său este pus să fixeze acelaşi tip de antigen cuplat cu izotop (detectare de anticorp prin intermediul antigenului marcat — trusa AUSAB) ;

— anticorpul care îmbracă faza solidă reţine antigenul corespunzător din proba examinată, iar acesta este recunoscut cu ajutorul aceluiaşi anticorp marcat (tehnica directă) sau cu ajutorul unui anticorp fără ra-

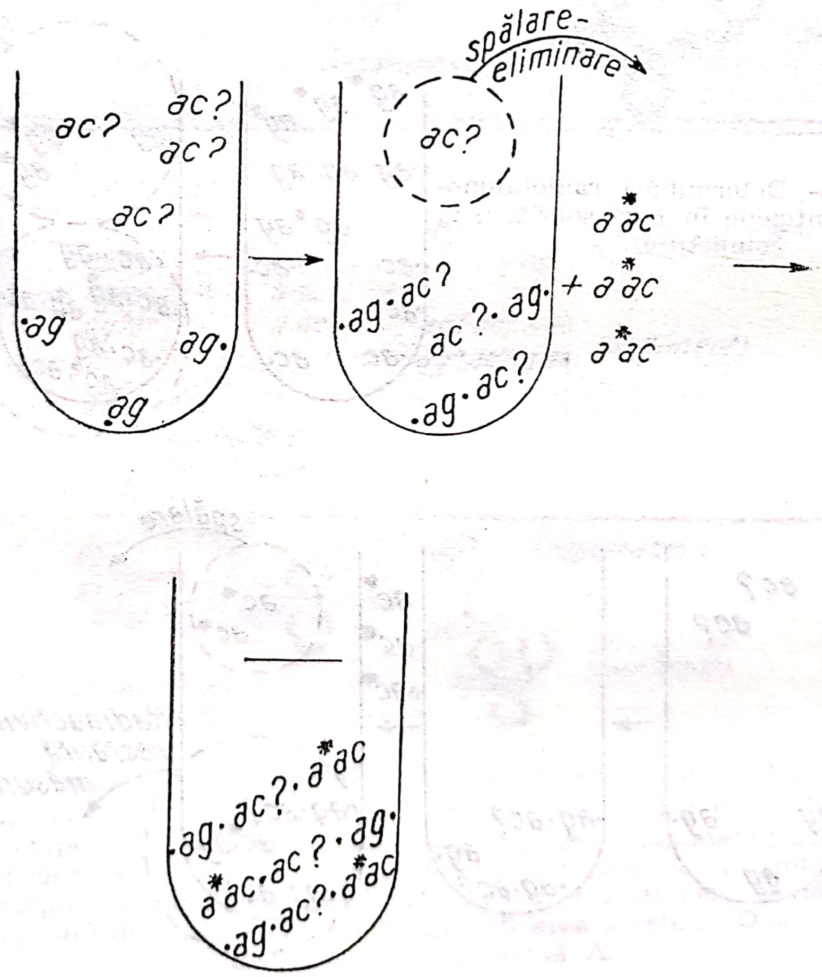


Fig. 15-8 — Detectare de anticorp.

dionuclid, acesta fiind purtat de antiglobulina corespunzătoare (detectare de antigen) (fig. 15-9).

Uneori, în intenția de a detecta un antigen viral s-a efectuat îmbrăcarea fazei solide chiar cu materialul ce se examina, antigenul prezent fiind reținut direct pe suportul inert; el este recunoscut fie direct cu anticorp marcat, fie indirect, prin tratare mai întîi cu anticorp specific și apoi cu antiglobulina marcată cu radionuclid.

În mod practic, indiferent de destinația investigării — detectare de antigen sau de anticorpi — se folosește faza solidă „îmbrăcată" în prealabil în condiții standard; aceasta se tratează cu materialul supus examinării și, după un interval adecvat, se continuă cu tratarea în etape a fazei solide pe care se rețin succesiv factorii care intră în reacție. La

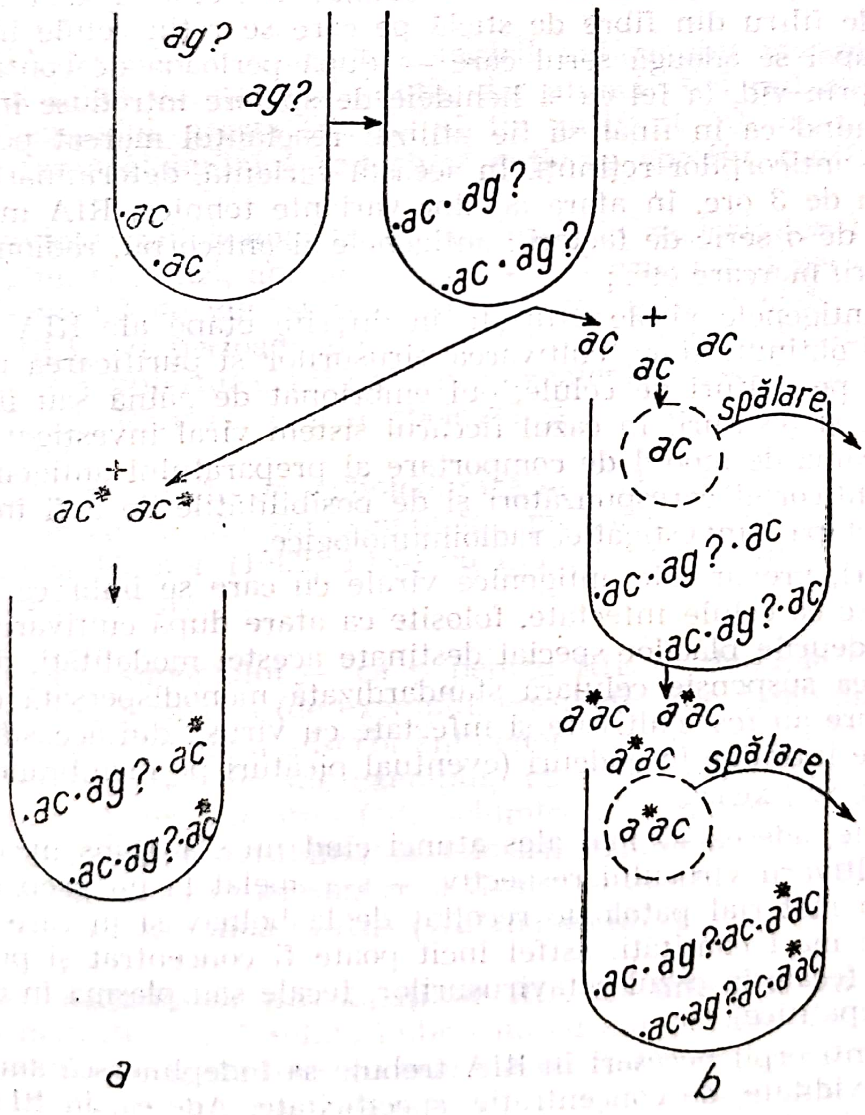

ag?
ag?
.ac
.ac
.ac·ag?
.ac·ag?
+
ac ac
ac
spălare
ac
.ac·ag?·ac
.ac·ag?·ac
a*ac a*ac
a*ac
spălare
a*ac
.ac·ag?·ac·a*ac
.ac·ag?·ac·a*ac
+
ac* ac*
.ac·ag?·ac*
.ac·ag?·ac*
a
b

Fig. 15-9 — Detectare de antigen.
a — procedeu sandwich cu un singur anticorp (procedeu direct); *b* — procedeu sandwich cu dublu anticorp (procedeu indirect).

fiecare astfel de tratare, faza solidă se spală de mai multe ori spre a se elimina urmele de material nereținut în cursul reacției imunologice.

Tratarea și spălarea se efectuează în concordanță cu felul fazei solide : în eprubete se introduc diferiți reactanți, care apoi se elimină prin răsturnare sau absorbție ; bilele se introduc succesiv în godeuri de mărime adecvată conținînd reactanții sau soluțiile de spălare. În cazul folosirii membranelor filtrante, reactanții se depun cu picătura, iar spălarea membranelor se realizează fie în băi cu soluțiile corespunzătoare, fie prin trecerea soluțiilor de spălare prin membrană (filtrare la vacuum).

Există astăzi o largă varietate de modalități de efectuare a RIA ; apreciate sînt plăcile cu godeuri, acestea din urmă fiind decupate pe rînd și introduse în recipiente (eprubete) adecvate aparatului de măsurat. De asemenea, cu posibilitatea de prelucrare simultană a mai multor probe apare varianta prin care Richman și colab. (1981, 1984) investighează anticorpii față de virusul varicella-zoster într-o placă cu 96 de godeuri, prin care se pot face filtrări sub vacuum : în fiecare godeu se folosește un disc de filtru din fibre de sticlă pe care se rețin celule infectate cu virus și apoi se adaugă serul care — după perioada de contact — este absorbit prin vid, la fel ca și lichidele de spălare introduse în mod succesiv, urmînd ca în final să fie utilizat reactantul marcat pentru recunoașterea anticorpilor reținuți. În această variantă, determinările durează mai puțin de 3 ore. În afara acestor variante tehnice, RIA mai este dependentă de o serie de factori : antigenele și anticorpii, radionuclidul folosit pentru marcare etc. ;

— Antigenele virale utilizate în diferite etape ale RIA constau în preparate obținute după cultivarea virusurilor și purificarea recoltei obținute de pe culturi de celule, oul embrionat de găină sau în suspensii de organe și țesuturi. În cazul fiecărui sistem viral investigat trebuie să se țină seama de modul de comportare al preparatului antigenic în reacțiile cu anticorpii corespunzători și de posibilitățile de a fi inclus într-o anumită etapă a investigației radioimunologice.

Uneori, preparatele antigenice virale cu care se îmbracă faza solidă se întîlnesc ca celule infectate, folosite ca atare după cultivare pe lamele sau în godeurile plăcilor special destinate acestei modalități, dar cel mai frecvent ca suspensie celulară standardizată monodispersată din flacoanele în care au fost cultivate și infectate cu virus ; din această suspensie celulele se introduc în godeuri (eventual picături pe membrane filtrante), se usucă și se fixează.

În fine, adesea — mai ales atunci cînd nu s-a ajuns încă la posibilitatea cultivării virusului respectiv — s-a apelat la un preparat obținut direct din material patologic recoltat de la bolnav și în care virusul se găsește în mari cantități, astfel încît poate fi concentrat și purificat (de exemplu, fecale în cazul rotavirusurilor, fecale sau plasmă în cazul virusurilor hepatitice).

— Anticorpii necesari în RIA trebuie să îndeplinească anumite condiții de aviditate, de concentrație, specificitate. Adesea, în RIA s-au folosit seruri de la om, în special în convalescență, dar astfel de seruri trebuie verificate, bine caracterizate și purificate, eventual pînă la cromatografie de afinitate pe coloane, folosind antigene adecvate.

Cel mai frecvent în RIA ne adresăm serurilor obținute prin imunizarea animalelor. În alegerea serurilor animale și a modului lor de preparare trebuie să se țină seama, pe de o parte, de felul în care acestea răspund față de anumiți determinanți antigenici ai virusurilor în cauză (de exemplu, serul de convalescent cel mai frecvent se adresează determinantului *a* al antigenului HBs, în timp ce cobaiul răspunde bine la antigenele *d* și *y*, iar iepurele produce seruri bune pentru antigenele *w* și *r*), de prezența unor virusuri latente și a anticorpilor corespunzători (de exemplu, virusuri herpetice latente la animale).

Utilizarea anticorpilor monoclonali a adus un plus de specificitate investigațiilor RIA, și mai ales permite să se lucreze cu determinanți antigenici strict caracterizați ; eventual, în etape diferite se folosesc cupluri determinant — anticorp diferite. Totuși, întrucît fiecare clonă celulară produce anticorpi cu caracteristici fizico-chimice și imunologice diferite, aplicarea lor în RIA impune stabilirea strictă a condițiilor necesare fiecărui sistem viral.

În RIA bazată pe competiția legării antigenului marcat, se poate folosi serul imun ca atare în diluții, dar atunci cînd radionuclidul este atașat anticorpului, acesta trebuie să fie purificat într-un anumit grad (fracțiune imunoglobulinică sau chiar anticorp specific purificat).

În privința radioizotopilor, se apelează în majoritatea cazurilor la cei ai iodului, și astăzi, aproape exclusiv, ^{125}I care are o perioadă de înjumătățire de 60 de zile și este un emițător gamma slab ; ^{131}I, folosit inițial în RIA, cu perioada de înjumătățire de numai 8 zile și emisie gamma și beta puternică, prezintă inconveniente aferente și de fapt s-a renunțat la el. Rareori se mai apelează și la alți radionuclizi, precum technetium etc.

Dintre modalitățile de radioiodurare — îndeosebi prin folosirea reziduurilor tirozinice ale componentelor proteice — cea preconizată de Greenwood și Hunter (1962, 1963) cu ajutorul cloraminei T mai are și astăzi o largă aplicare.

Îmbrăcarea suportului — ca și pentru RIE — depinde de numeroși factori : felul și forma sa (de exemplu, eprubete, bile, lame din materiale plastice), capacitatea de a adsorbi antigenele sau anticorpii în mod direct sau după prelucrarea lor (de exemplu, cu poliL-liznă, tratare cu glutaraldehidă etc.), proprietățile fizico-chimice ale antigenelor sau anticorpilor etc. Reamintim posibilitatea folosirii celulelor infectate, cultivate sau depuse ca suspensii pe suport și fixate pe acesta, ca și folosirea hîrtiei de filtru ca fază solidă în RIA (Watanabe, 1977).

Astăzi, majoritatea investigațiilor RIA în infecțiile virale folosesc anticorpi marcați și fază solidă îmbrăcată cu antigen sau anticorpi și variantele tehnice apar similare cu cele ale reacțiilor imunoenzimatice. Elementul important spre a se putea realiza o specificitate și o sensibilitate înaltă este, deci, puritatea și reactivitatea anticorpilor. În determinările de tip sandwich, uneori anticorpul folosit la îmbrăcarea fazei solide și cel prin care se identifică antigenul reținut au aceeași proveniență, dar, mai ales atunci cînd este vorba de o tehnică indirectă, alegerea anticorpilor specifici provenind de la specii diferite asigură un grad ridicat de specificitate, reducînd reacțiile fals pozitive.

În ultima perioadă, RIA a cunoscut o ameliorare importantă prin folosirea proteinei A stafilococice marcate cu ^{125}I ; capacitatea reactantului de a se combina cu imunoglobuline de la unele specii animale a făcut posibilă folosirea sa în investigarea antigenelor virale în tehnici de tip indirect, înlocuind antiglobulina marcată și astfel eliminînd neajunsurilor proprii acesteia, printre care și fondul nespecific ridicat (Richman, 1981).

În general, RIA poate fi pînă la 1 000 de ori mai sensibilă în comparație cu imunodifuzia și de 100 de ori în comparație cu fixarea complementului ; exemplificarea sensibilității sale situează limite de detectare ale antigenului HBs la 0,1—1 ng/mL, cu o echivalare de 10^7—10^8 particule/mL.

În detectarea de anticorpi, RIA prezintă marele avantaj că, pe lîngă sensibilitatea înaltă pe care o are, poate fi folosită pentru stabilirea claselor de imunoglobuline cărora le aparțin, cu condiția ca antiglobulina marcată cu radioizotop să fie adresată IgM sau IgG.

În investigarea IgM și IgG specifică în cursul infecției cu virus herpetic sau citomegalovirus, Torfarson și Diderholm (1982) elimină reacțiile fals pozitive în RIA prin înlăturarea factorului reumatoid, cu ajutorul proteinei A stafilococice.

RIA determină limitele antigenului sau anticorpilor prezenți, în general prin stabilirea diluției-limită la care radioactivitatea înregistrată în experiment este semnificativ deosebită de cea a fondului ; stabilirea unor curbe standard asigură aspectul cuantificării prin RIA.

În ameliorările tehnice de astăzi, RIA devine un mijloc de diagnostic rapid în infecțiile virale, putînd rezolva materialele aduse pentru investigare în numai cîteva ore.

Dintre infecțiile virale, hepatita virală a fost cea care a beneficiat cel mai mult pînă în prezent de investigare prin RIA, cu adresă la diferite antigene și variați anticorpi (HBs, HBe, HBc) ; investigațiile *princeps* de tip competitiv au avut antigenul HBs marcat.

O gamă foarte largă de sisteme virale a fost abordată prin mijlocirea RIA (Smith, 1974 ; Patterson, 1973 ; Charlton, 1975 etc.) ; totuși dificultățile pe care le ridică procedeul face ca, astăzi, în mod practic, interesul laboratorului de diagnostic să fie dirijat către RIE.

15.3.7. PROCEDEE BAZATE PE PRECIPITAREA COMPLEXELOR ANTIGEN — ANTICORP

Reacțiile de precipitare au devenit utile diagnosticului virusologic abia odată cu realizarea lor într-un gel de agar, agaroză, gelatină etc. : s-a constatat că antigenele solubile și anticorpii corespunzători pot precipita într-un gel, respectivul precipitat fiind permeabil pentru antigene și anticorpi deosebiți.

Dintre variantele bazate pe precipitarea în gel menționăm :

— *Dubla difuzie în gel după Ouchterlony* a permis să se studieze antigene virale şi să ajute la identificarea unor componente şi respectiv să identifice anticorpii.

— *Imunodifuzia radială după Mancini* asigură şi astăzi, în anumite sisteme virale (de exemplu, gripă), aprecierea unei anumite fracțiuni antigenice dintr-un preparat viral, ca şi stabilirea nivelului anticorpilor serici, mai ales în cazul probelor duble, cînd se înregistrează seroconversia caracteristică (fig. 15-10).

— Procedee de precipitare în gel efectuate concomitent cu aplicarea unui cîmp electric realizează posibilități deosebite pentru studiul componentelor unui preparat antigenic viral prin desfăşurarea lor prealabilă — aşa cum realizează o imunoelectroforeză obişnuită — sau asigură stabilirea fracțiunii globulinice dotate cu activitate specifică unui anumit antigen.

Migrarea unui reactant prin aplicarea curentului electric la capetele gelului în care se află deja înglobat al doilea reactant poate permite aprecieri cantitative într-un timp mult mai redus decît într-o probă de tip Mancini. Dacă se adaugă aplicarea curentului electric succesiv pe două direcții, aprecieri cantitative se pot face diferențiat pentru diferitele com-

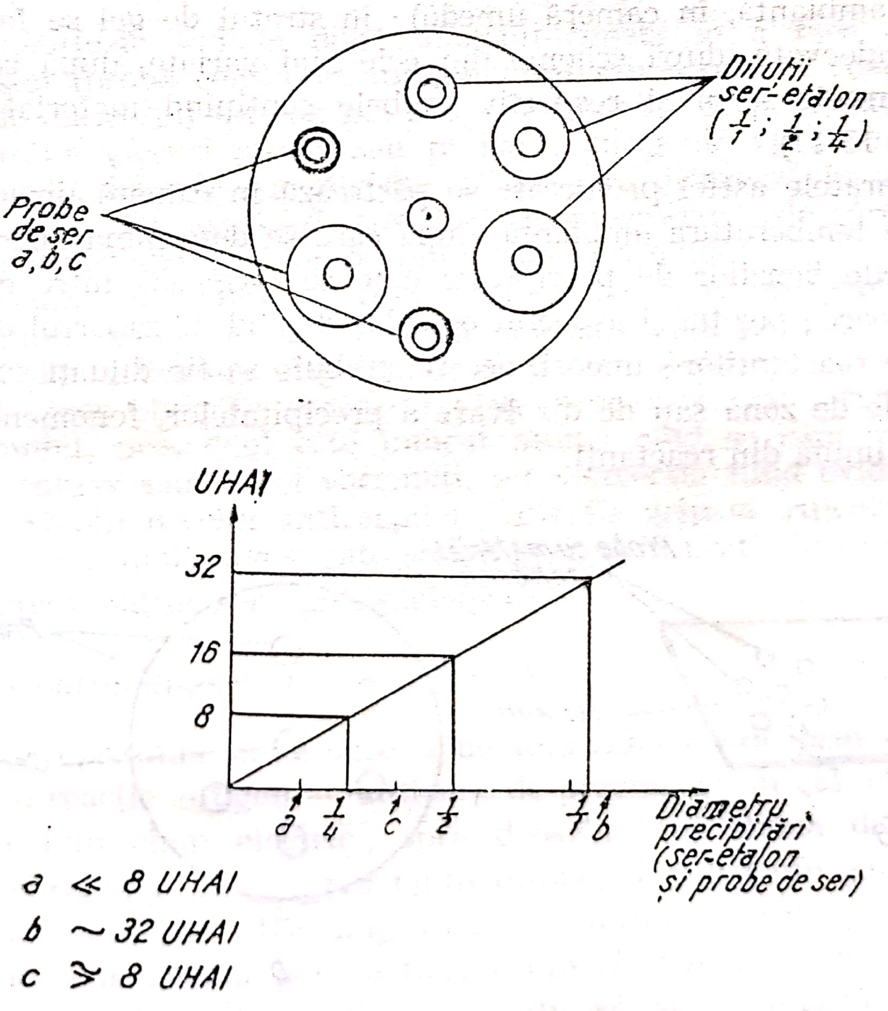


Fig. 15-10 — Imunodifuzie radială pentru determinare de anticorpi.

ponente ale unui preparat viral desfășurat în timpul primei migrări; utilitatea procedeului este îndeosebi pentru cercetare, dar uneori este eficientă și în diagnostic. De altfel, și alte variante au mai fost elaborate în același sens.

Diagnosticul infecțiilor virale a beneficiat în mod deosebit de efectuarea unei duble difuzii în cîmp electric, realizîndu-se în acest caz ceea ce se cunoaște sub numele de *contraimunoelectroforeză* (CIEF), procedeu dotat cu o sensibilitate superioară probei de tip Ouchterlony și cu avantajul unei rezolvări rapide, de 30—90 de minute. CIEF a căpătat o largă utilizare pentru diagnosticul infecțiilor virale, atît în cazul detectării unor antigene — chiar direct în probele recoltate de la bolnavi —, cît și pentru determinări de anticorpi.

15.3.7.1. *Dubla difuzie în gel (DD)*

Procedeul se efectuează într-un strat de agar sau agaroză (de obicei 0,8—1,5% concentrație, într-un tampon adecvat sau chiar numai soluție salină 0,15 M); agarul sau agaroza topite prin fierbere se toarnă în cantitate potrivită dimensiunilor suportului (de exemplu, 2—2,5 mL pentru o lamă de microscop) și se lasă să se solidifice (cel puțin o oră, la temperatura ambiantă, în cameră umedă); în stratul de gel se fac găuri la distanțe adecvate, după scheme din cele mai variate, după care se introduce în ele serul și respectiv probele conținînd material antigenic viral (fig. 15-11).

Preparatele astfel prelucrate se păstrează în cameră umedă, 24—72 de ore, la temperatura ambiantă, după care se determină apariția și caracteristicile benzilor de precipitare care se formează între găurile corespunzătoare; poziția și aspectul benzilor depind de raportul dintre concentrațiile reactanților; uneori, aceștia trebuie să fie diluați spre a evita fenomenele de zonă sau de dizolvare a precipitatelor, fenomene datorate excesului unuia din reactanți.

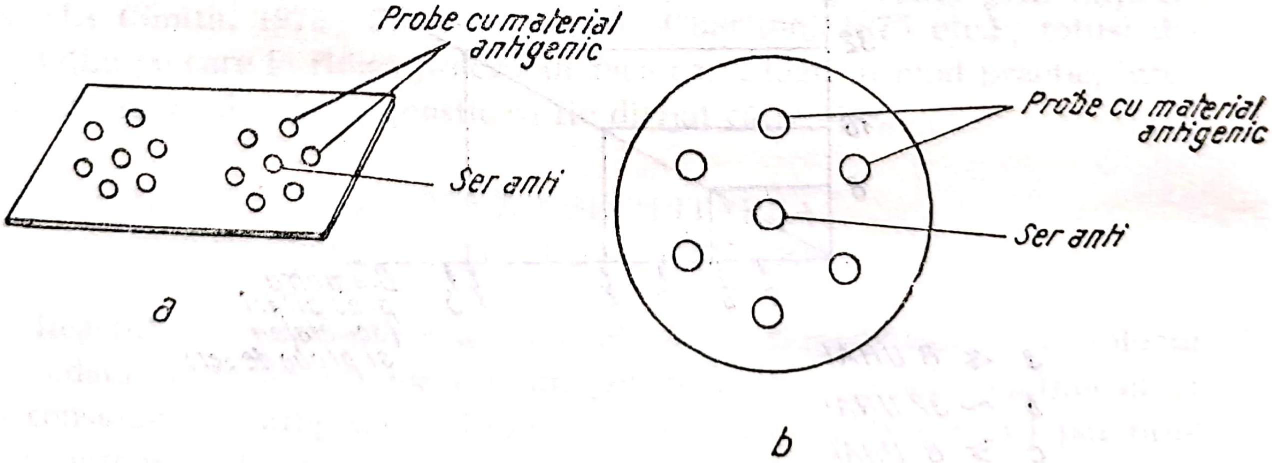


Fig. 15-11 — Schema aranjării reactanților în dubla difuzie. *a* — pe lamă; *b* — în cutia Petri.

În funcţie de poziţia benzilor în sistemul cercetat faţă de cele din sistemele de control folosite, se stabileşte identitatea totală sau parţială a reactanţilor (fig. 15-12).

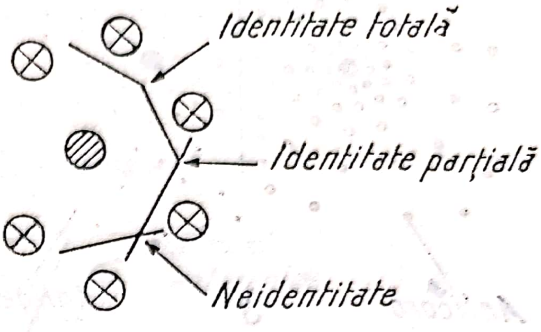


Fig. 15-12 — Schema reacţiilor de precipitare în gel în dubla difuzie : ⊗ — diferite antigene virale ; ▨ — ser imun.

Deşi dubla difuzie după Ouchterlony are o sensibilitate redusă şi necesită un interval suficient de lung pentru realizare, ea a fost folosită în numeroase sisteme virale, dintre care menţionăm numai diagnosticul realizat în hepatita virală B, ca şi recomandarea OMS ca test de diagnostic în variolă.

15.3.7.2. *Imunodifuzia radială*

Imunodifuzia radială după Mancini constă în a face să migreze un reactant (probă conţinînd antigen viral sau seruri în cazul determinărilor de anticorpi) într-un gel care are înglobat în prealabil reactantul corespunzător (seruri imune sau preparat antigenic viral cunoscut) ; în jurul găurilor în care s-a introdus şi din care difuzează în jur reactantul cercetat se formează arii circulare de precipitare, ale căror dimensiuni sînt proporţionale cu componenta activă prezentă.

Aşa cum am menţionat, procedeul se mai foloseşte pentru aprecierea bagajului antigenic din unele preparate virale (de exemplu, hemaglutinina din vaccinuri gripale), ca şi pentru determinarea anticorpilor serici, al căror nivel se apreciază prin compararea cu seruri-etalon. În mod deosebit, procedeul este indicat atunci cînd se examinează probe duble la bolnav sau la cei vaccinaţi, seroconversia fiind evidentă şi fără a se mai stabili nivelul anticorpilor ; infecţia gripală, rujeola şi rubeola au fost cel mai mult investigate astfel, procedeul pretîndu-se în mod deosebit la investigaţiile seroepidemiologice.

15.3.7.3. *Contraimunoelectroforeaza (CIEF)*

CIEF reprezintă un procedeu de imunodiagnostic prin care se evidenţiază o reacţie antigen — anticorp de precipitare în gel, efectuată sub influenţa unui cîmp electric ; spre deosebire de dubla difuzie în gel după Ouchterlony, în care reactanţii difuzează radial din găurile în care au fost introduşi, în CIEF migrarea reactanţilor este dirijată pe acelaşi ax, dar în sens contrar pentru fiecare din ei, pentru ca în zona de realizare a raportului optim antigen — anticorp să se producă precipitarea sub aspectul benzilor situate între cele două găuri (fig. 15-13).

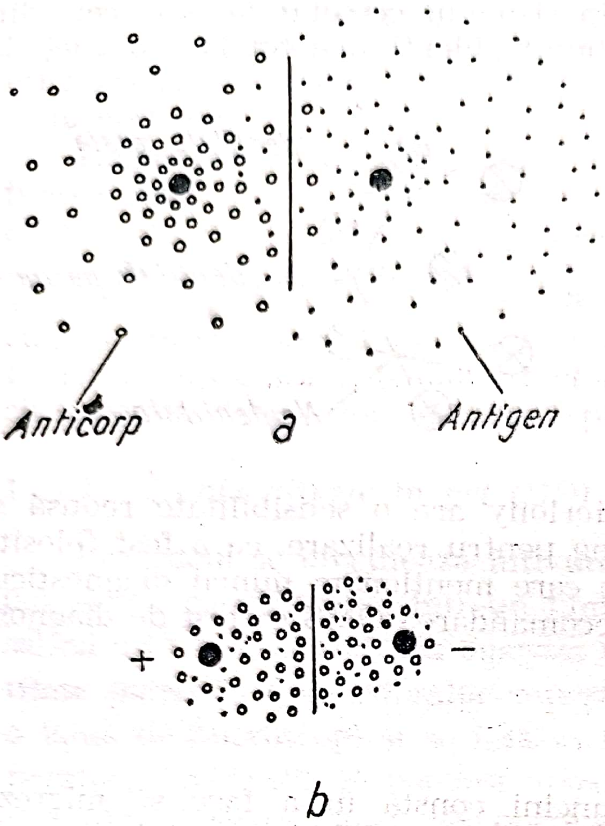


Fig. 15-13 — Schema realizării precipitării în dubla difuzie în gel (DD) și contraimunoelectroforeză (CIEF). *a* — *DD* (difuzie radială cu diluarea reactanților în gel) ; *b* — *CIEF* (migrare în sens contrar a reactanților menținuți pe linia de migrare).

La baza CIEF — ca în oricare procedeu imunoelectroforetic — se află migrarea ionilor cu încărcătură pozitivă sau negativă (cationi sau respectiv anioni) către catod sau — în mod corespunzător — către anod atunci cînd se aplică o diferență de potențial la capetele benzii de agar sau agaroză gelificată, în care acești ioni se găsesc ca o componentă a tamponului sau au fost adăugați ca produs de cercetat. Antigenele și anticorpii — care au proprietăți amfoterice — se comportă ca anioni sau cationi, în funcție de pH-ul pe care îl are tamponul ; majoritatea antigenelor virale sînt puternic încărcate negativ la un pH moderat alcalin și migrează către anod, în timp ce anticorpii — imunoglobuline slab încărcate — se antrenează pasiv de către curentul endosmotic care circulă către catod. În acest fel reactanții circulă unul către celălalt, de unde și denumirea general acceptată a procedeului, de contraimunoelectroforeză. Procedeul a căpătat însă și alte denumiri : *counter current imunoelectrophoresis*, *electroimmunoosmophoresis*, *electrosyneresis*, imunoelectroprecipitare etc. (fig. 15-14).

Deși în CIEF s-au folosit diferite tipuri de geluri (agar de diferite calități și grade de purificare), cel din agaroză este cel mai indicat, existînd astăzi sorturi cu un indice ridicat de electroendosmoză, deosebit de favorabile efectuării CIEF. CIEF a utilizat ca suport și membrana de acetat de celuloză (Pauri, 1980) dar, deși cu unele avantaje tehnice, pune probleme de aprovizionare și păstrare adecvată a acestora ; uneori prelungește durata investigației (banda se spală, se colorează, transparentizează).

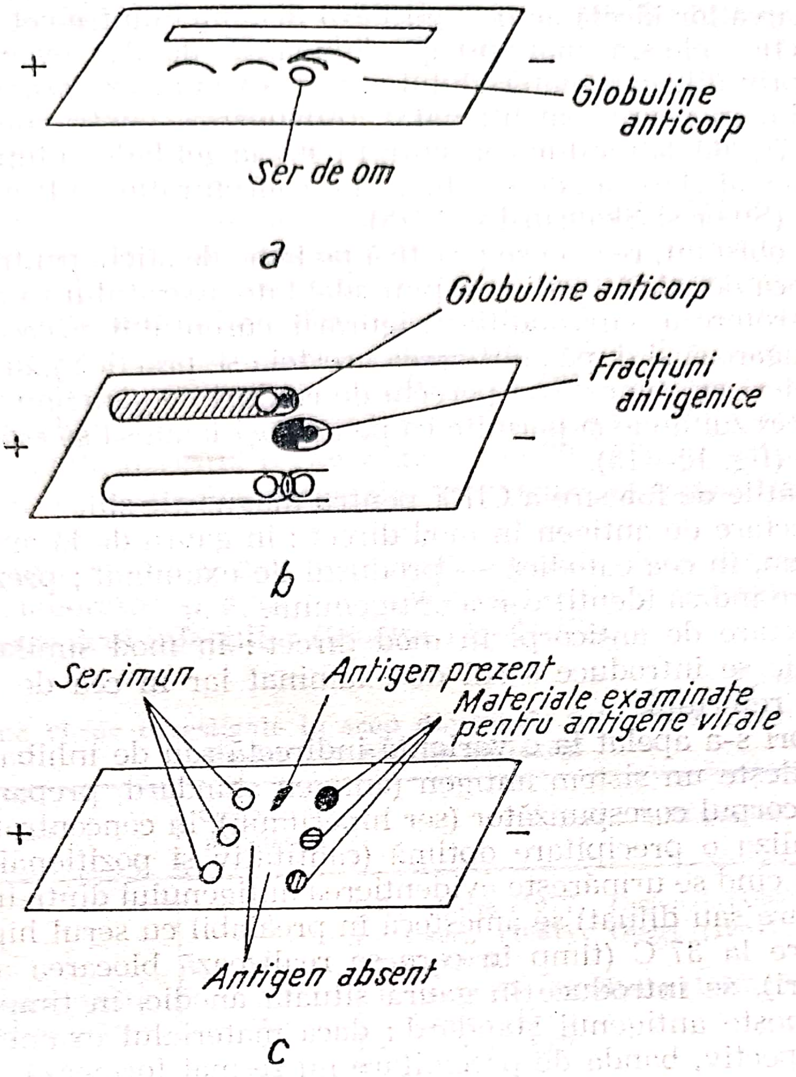

+
−
Globuline anticorp
Ser de om
a
Globuline anticorp
Fracțiuni antigenice
+
−
b
Ser imun
Antigen prezent
Materiale examinate pentru antigene virale
+
−
Antigen absent
c

Fig. 15-14 — Principiul CIEF.
a — desfășurarea proteinelor serice prin electroforeză ; *b* — migrarea reactanților în CIEF ; *c* — evidențierea reacției antigen — anticorp prin CIEF.

Eventualul CIEF poate fi completată prin tratare cu un conjugat fluorescent sau enzimatic (PO) ceea ce evidențiază mai multe benzi de precipitat (ELIEDA) (Pinon și Dropsy, 1977). Curentul electroendosmotic este favorizat de un tampon mai puțin concentrat ca și de tampoane mai alcaline, ceea ce a dus la crearea sistemului de CIEF discontinuu : tamponul din gel are o forță ionică mai scăzută decît cel din rezervorul aparatului de electroforeză.

În ansamblu, o serie de condiții asigură desfășurarea eficientă a CIEF : tamponul (de obicei, barbital sau Tris-HCl), pH-ul acestuia (8,2—8,6) și forța ionică (μ=0,05—0,075), felul agarozei, concentrația sa (în jur de 1%) ca și grosimea pe care o are gelul (1—2 mm), mărimea și distanța dintre găurile în care se introduc reactanții ; intensitatea curentului continuu variază de la 1 la 2,5 mA/cm. Evidențierea benzilor de precipitare se face după o migrare de 30—90 de minute ; uneori, deși reacția antigen — anticorp are loc, benzile nu se văd decît după colorarea preparatului. Localizarea lor ideală ar fi la mijlocul distanței dintre cele două găuri, dar, în practică, ele sînt mai aproape de una sau de alta, eventual curbate (ajustarea prin diluarea materialului care se examinează asigură formarea precipitatului în poziția menționată). Adăugarea dextranului (greutate moleculară 70 000 daltoni) în concentrații 4% la gel face ca liniile de precipitare să fie mai clare și adesea chiar la o concentrație mult mai scăzută a antigenului (Siber și Skaprinsky, 1978).

În mod obișnuit, reacția se practică pe lame de sticlă pentru microscop sau pe o placă de sticlă cu dimensiuni adaptate aparatului în care se efectuează electroforeza, cu condiția asigurării curentului necesar. Lama se acoperă cu agaroză și după gelificarea acesteia se practică găuri în rînduri paralele ; folosirea chiar a trei perechi de rînduri de găuri nu influențează semnificativ rezultatele și permite ca pe aceeași lamă să se examineze mai multe probe (fig. 15—15).

Modalitățile de folosire a CIEF pentru diagnostic sînt :

— Detectare de antigen în mod direct : în gaura de la anod se introduce ser imun, în cea catodică — produsul de examinat ; prezența benzii de precipitare indică identificarea antigenului.

— Detectare de anticorpi în mod direct : în mod similar, în gaura situată anodic se introduce serul de examinat iar în cea de la catod — antigenul de referință.

— Uneori s-a apelat la o variantă indirectă sau de inhibare. În acest scop se stabilește un sistem antigen (antigen standard, preparat în laborator) și anticorpul corespunzător (ser hiperimun), în concentrații adecvate pentru a realiza o precipitare optimă (cantitativ și pozițional) în cursul CIEF. Atunci cînd se urmărește evidențierea antigenului dintr-un material, acesta (ca atare sau diluat) se amestecă în prealabil cu serul hiperimun și, după incubare la 37°C (timp în care se realizează blocarea anticorpilor corespunzători), se introduce în gaura situată anodic, în timp ce cea de la catod primește antigenul standard ; dacă materialul examinat conține antigenul respectiv, banda de precipitare nu se mai formează, așa cum se întîmplă între găurile sistemului antigen — anticorp neblocat. Detectarea anticorpilor dintr-un ser provenit de la bolnav se face în mod similar : cu antigenul standard se incubează acest ser și amestecul se introduce apoi în gaura de la catod, cea de la anod primind anticorpul cunoscut.

Procedeul indirect impune stabilirea prealabilă a unor raporturi antigen standard — ser hiperimun, un control pentru ca produsele care par-

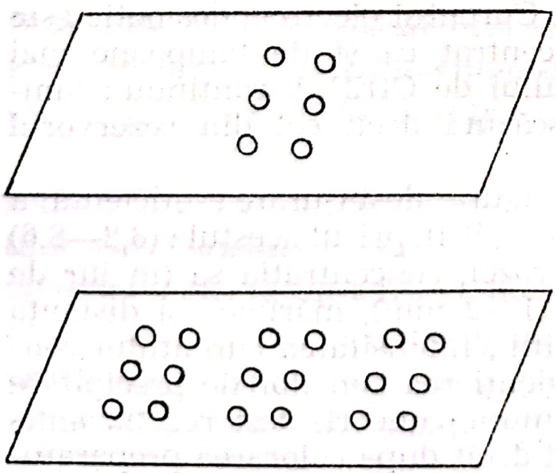


Fig. 15-15 — Schema poziției găurilor în gel, pe lamă de microscop, pentru CIEF.

ticipă la reacția de inhibare să nu reacționeze nespecific între ele și folosirea materialelor ce se examinează în diluții adecvate.

Varianta de detectare prin inhibarea CIEF a fost folosită pentru detectarea unor antigene sau anticorpi virali și pare utilă mai ales în sistemele în care precipitarea se realizează cu greu (de exemplu, în diagnosticul virusului rabic).

În orice caz s-a stabilit că, pentru a fi eficient în CIEF, serul imun trebuie să aibă un titru suficient de mare — apreciat prin alte procedee — iar antigenul viral nu este detectat decît dacă are o concentrație adecvată (de exemplu, antigenul urlian din lichidul alantoidian este detectat prin CIEF numai de la o concentrație echivalentă cu 80 UHA, iar serurile de la bolnavi cu infecție urliană sînt pozitive în CIEF numai la o activitate hemaglutinoinhibantă de cel puțin 1/20) ; de obicei, antigenele preparate în culturi de celule necesită o concentrare de 20—100 de ori iar în cazul virusului polio — masă mică antigenică *per* virion — concentrarea trebuie să fie și mai mare.

CIEF a fost studiată mai întîi experimental cu antigene și seruri preparate în laborator și apoi s-a aplicat diferitelor sisteme virale spre a realiza diagnosticul infecțiilor (tabelul 15—XVII).

TABELUL 15-XVII

Unele sisteme virale investigate în scop diagnostic prin CIEF pentru detectare de antigen sau de anticorpi

Sistem viral	Componenta investigată	Indicații bibliografice
Virusuri rota	Ag	Grauballe (1977) ; Dagenais (1980) ; Pauri (1980) ; Ekern (1981) ; Obert (1981) ; Korich (1983)
	Ac	Dei (1980)
Virusuri în gastroenterite infantile transmisibile	Ag	Bohac (1975) ; Middleton (1976) ; Tufvesson (1976);
	Ac	Spence (1977)
	Ac	Middleton (1976)
Virusuri corona	Ag	Dea (1979)
Virusuri adeno	Ag	Hierholzer (1974) ; Retter (1979) ; Jacobsson (1979) ; Gary (1979) ; Mankikar (1979)
	Ac	Hierholzer (1979) ; Petric (1979)
Virus cu incluzii citomegalice	Ag	Sweet (1979)
	Ac	Fortunato (1977) ; Niebojewski (1977) ; Smith (1978) ; Sweet (1979) ; Tănase (1986)
Virus hepatitic B	Ag	Gocke (1970) ; Prince (1970) ; Schmidt (1971) ; Craig (1971) ; Alter (1971) ; Apostolov (1971) Milner (1972) ; Babeș (1974)
	Ac	Schmidt (1971)
Virusuri pox	Ag	Babeș (1972) ; Meher (1975) ; Sehgal (1977)
Virusuri arbo	Ag	Balfour (1974) ; Churdboonchart (1974, 1978)
	Ac	Balfour (1973) ; Traavik (1977) ; Churdboonchart (1981)
Virusuri entero	Ag	Brown (1976)
	Ac	Minor (1979) ; Zalesnik (1979)
Virusuri gripale	Ag	Berlin (1972) ; Roussi-Cahill (1975) ; Lecompte (1979)
Virus urlian	Ac	Norden (1975)
Virus rabic	Ag	Diaz (1976)
	Ac	Diaz (1976, 1982)
Virus herpetic	Ag	Jeansson (1972)
Virus Papova	Ac	Dei (1982)

Aprecierea rezultatelor obținute stabilește următoarele :

— Sensibilitatea reacției este de ordinul microgramelor și chiar la cantități de antigen sub 1µg.

— În detectarea unor antigene virale (de exemplu, rotavirusuri în fecale), proporția cazurilor pozitive prin CIEF s-a situat la niveluri foarte apropiate de cele realizate cu alte procedee mai complicate (de exemplu, microscopia electronică sau chiar cu RIE).

— În produsul examinat trebuie să fie suficient material viral ; în caz contrar se apelează la concentrare (de exemplu, rotavirusurile în fecale au fost evidențiate după concentrarea suspensiei din aceste materii, cu PEG 6 000) (Dagenais, 1980) sau inocularea sistemelor biologice sensibile și identificare direct în produsele acestora, eventual cu concentrare (de exemplu, PEG 6 000 sau ultracentrifugare).

— Atunci cînd se aplică CIEF la un anumit sistem viral, trebuie ca în prealabil să se stabilească capacitatea precipitantă a componentelor virale, ca și modul lor de migrare în cîmp electric, mai ales că așa-zisul „antigen viral“ este de fapt un complex ale cărui componente pot migra diferit (de exemplu, la virusul leucemiei bovine componenta p24 migrează catodic, în timp ce gp60 se deplasează anodic) ; în gastroenterita transmisibilă, Bohac arată că la pH 8,6 — obișnuit folosit în CIEF — antigenul migrează catodic și sugerează modificarea aranjamentului reactanților ; în anumite situații se poate efectua în prealabil o așa-numită anodizare a antigenului (tratare cu formol, acid fenilboronic etc.) sau să se introducă un tampon adecvat punctului izoelectric al antigenului (fig. 15—16).

Calitatea CIEF ar putea cîștiga odată cu folosirea unor anticorpi monoclonali în sisteme corespunzătoare antigenului.

— Serurile sînt eficiente în CIEF dacă au o capacitate precipitantă înaltă ; pentru cele hiperimune folosite ca reactant de diagnostic această condiție se verifică în prealabil la prepararea lor. Condiția menționată

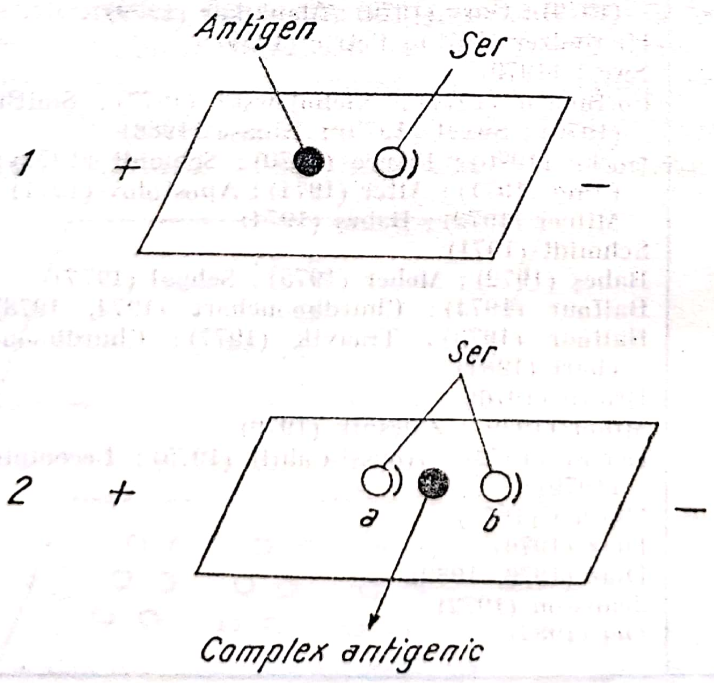


Fig. 15-16 — CIEF în condiții deosebite (după Bohac, 1975). *1* — schema aranjării rectanților în cazul antigenului migrînd catodic la pH 8,6 ; *2* — schema aranjării reactanților pentru complexe cu componente antigenice ce migrează diferit ; *a* — precipitare de component cu migrare anodică și *b* — precipitare de component cu migrare catodică.

atrage atenția asupra momentului în care se recoltează serul de la bolnavi, care trebuie să corespundă apariției și atingerii unui nivel ridicat de anticorpi precipitanți.

Titrurile serurilor față de antigene virale apar reduse în CIEF în comparație cu nivelul lor în alte reacții : de exemplu, un ser care în RFC este efectiv la o diluție de 1/512, în CIEF nu a putut produce precipitare decît cel mult la o diluție de 1/4—1/8.

Examenele serologice prin CIEF trebuie să țină seama că anticorpii precipitanți evidențiați au o dinamică diferită de aceea a altor activități (de exemplu, apar mai tîrziu decît cei hemaglutinoinhibanți și persistă mult mai puțin).

Totuși, în studiile făcute în diferite sisteme virale s-a constatat că proporția serurilor pozitive în CIEF corelează bine cu aceea realizată prin alte procedee serologice, de la HAI pînă la unele considerate ca foarte sensibile (de exemplu, ELISA). Determinarea serologică prin CIEF s-a dovedit posibilă și după tratarea serului cu 2-mercaptoetanol, ceea ce a sugerat posibilitatea de folosire a procedeului în identificarea anticorpilor de tip IgM (Minor, 1979).

CIEF oferă cîteva avantaje laboratoarelor care utilizează acest procedeu ; în prezent — pînă la introducerea unor procedee de ultimă generație, dar mai complicate și mai puțin accesibile unor laboratoare din cauza dotării necesare — CIEF reprezintă încă mijlocul obișnuit de investigare în hepatitele virale B și în afecțiunile diareice ale copilului ; antigenele hepatitice Bs și Be, ca și anticorpii corespunzători ce se găsesc în sînge, se detectează prin CIEF și contribuie la stabilirea profilului evolutiv al infecției ; antigenul rotaviral se excretă într-o cantitate atît de mare prin fecale, încît CIEF îl poate detecta cu o incidență asemănătoare cu ME sau chiar ELISA.

— Probele se rezolvă în cîteva ore, uneori chiar la 30 de minute, deci este un procedeu de mare rapiditate.

— CIEF se efectuează simplu, nu necesită aparatură deosebită, deci are mare accesibilitate, pînă la nivelul unor laboratoare care se deplasează în teren.

— Procedeul este foarte economic, are nevoie doar de cantități mici de reactanți.

— Permite efectuarea investigației pe multe probe simultan, deci este indicat pentru *screening* în teren.

— Mai ales în cazul investigărilor serologice, CIEF elimină prelucrările impuse de anumite procedee (HAI, RFC etc.).

— Antigenele virale pot fi detectate și în produsele în care se găsesc agenți virali necultivabili (de exemplu, adenovirusuri 40 și 41 din gastroenterite infantile, detectate la fel de bine ca și prin ME) sau cu putere hemaglutinantă prea scăzută, pentru a putea fi identificate rapid atunci cînd au fost izolate (de exemplu, unele virusuri arbo).

De altfel, CIEF se recomandă ca unul din procedeele simple și eficiente în identificarea și chiar tipizarea izolatelor virale prin folosirea directă a produselor obținute din sistemele biologice care au fost inoculate, eliminînd procedee mai complicate — RN, ELISA, RFC, HAI etc. — (de exemplu, antigene arbovirale în creierul sau sîngele șoarecilor nou-născuți ce au fost inoculați i.c., eventual înainte de manifestările de boală; antigen rabic, de asemenea în creier, la șoarecii inoculați; tipizarea virusului gripal după cultivare în ouă embrionate etc.).

Ar putea fi considerate ca dezavantaje ale CIEF unele aspecte de organizare, amintite deja (de exemplu, nevoia de a folosi seruri imune puternice, cu activitate precipitantă; eventuala anodizare a produselor ce se examinează etc.), ca și cantitățile mici de antigene virale prezente în probe, condiție care poate fi rezolvată convenabil prin concentrarea prealabilă cu PEG 6 000 ca și prin colorarea gelului după efectuarea migrării.

Dezavantajul real însă constă în precipitările nespecifice care apar în unele sisteme virale, cînd se examinează probe contaminate (de exemplu, în cazul identificării antigenului variolic direct în produse provenind de la bolnavi s-au citat precipitate nespecifice pînă la 83% din cazuri); în aceste situații CIEF impune prelucrări deosebite.

15.3.8. PROCEDEE DE AGLUTINARE PE SUPORT

Aceste procedee se bazează pe participarea unor particule de diferite mărimi, antrenate pasiv în cursul unor reacții antigen — anticorp de către reactantul căruia îi servesc drept suport, aglutinarea lor realizînd astfel vizualizarea acestei reacții, altfel nesesizabilă.

Particulele servesc drept suport fie antigenului, fie anticorpilor: în primul caz, reactantul astfel preparat servește de obicei pentru decelarea anticorpilor corespunzători, iar în al doilea — de obicei se urmărește decelarea antigenului corespunzînd anticorpilor care îmbracă particula-suport. În variante tehnice de blocare a uneia sau alteia din reacțiile de aglutinare pe suport, în condiții bine determinate, reactanții cuplați și cei liberi fiind folosiți la anumiți parametri, se poate evidenția antigenul sau, respectiv, anticorpii din proba ce se examinează.

Suporturile cel mai frecvent întîlnite pentru astfel de procedee sînt hematiile (reacția de hemaglutinare pasivă și variantele sale), latexul de polistiren (latexaglutinarea) și — mai recent — stafilococul Cowan I, care, prin proteina A prezentă în peretele bacterian, poate fi îmbrăcat cu anticorpi (coaglutinarea).

Îmbrăcarea particulelor cu reactanți — antigene sau imunoglobuline-anticorpi — se obține prin procedee tehnice variate, care frecvent se individualizează cu proveniența reactantului în cauză, probabil în funcție de structura chimică a acestuia.

Sensibilitatea reacțiilor de aglutinare pe suport este deosebit de ridicată (de exemplu, în anumite sisteme virale prin variante HAP se pot pune în evidență antigene la niveluri similare celor detectate prin RIA sau RIE).

Trebuie totuși avută în vedere posibilitatea apariției unor reacții nespecifice, mai ales cînd se investighează pentru prezența antigenelor virale anumite probe organice recoltate de la bolnav (de exemplu, urină sau LCR); evitarea acestor reacții este posibilă prin prelucrări adecvate (de exemplu, termoinactivarea urinei sau extragerea fecalelor cu fluorocarbon).

Procedeele de aglutinare pe suport au avantajul unei efectuări simple şi rapide, practic la patul bolnavului, asigurînd astfel un diagnostic precoce de mare sensibilitate (preţ de cost *per* analiză foarte redus, fără a fi nevoie de o dotare deosebită a laboratorului).

În cele ce urmează vor fi descrise latexaglutinarea şi hemaglutinarea pasivă, coaglutinarea urmînd a se discuta în secţiunea dedicată folosirii stafilococului Cowan I în diagnosticul infecţiilor virale.

15.3.8.1. *Latexaglutinarea (LA)*

Latexaglutinarea face parte din categoria procedeelor în care evidenţierea reacţiei antigen — anticorp se realizează prin aglutinarea particulelor de latex — suport pentru unul din reactanţi — antigen sau anticorp (Hammond, 1984) (fig. 15—17).

Particulele de latex sensibilizate cu antigen se utilizează pentru evidenţierea anticorpilor, modalitate mai rar realizată în diagnosticul infecţiilor virale ; îmbrăcarea latexului cu anticorpi realizează un preparat care, în prezenţa antigenului viral corespunzător, formează agregate vizibile cu ochiul liber.

Latexul cel mai frecvent utilizat este cel de polistiren ; particulele componente au dimensiuni submicroscopice şi s-au descris preparate cu particule de la 91 nm pînă la unele, mai frecvent, de 810 nm. Preparatele care urmează să fie sensibilizate sînt standardizate cu particule de aceeaşi mărime.

Îmbrăcarea particulelor se face în prezenţa unor cantităţi optime de antigen sau de anticorp — stabilite în prealabil prin încercări cu diluţii diferite din aceşti reactanţi (de exemplu, Sanekata şi colab., în 1981, stabilesc că o îmbrăcare cu 1 mg/mL IgG realizează un latex fără aglutinări nespecifice, foarte stabil) ; în cazul sensibilizării cu antigen s-a descris o sensibilitate maximă atunci cînd în suspensie rămîne şi o anumită cantitate redusă de reactant. Suspensia de latex sensibilizat se poate păstra la 4°C chiar 12 luni.

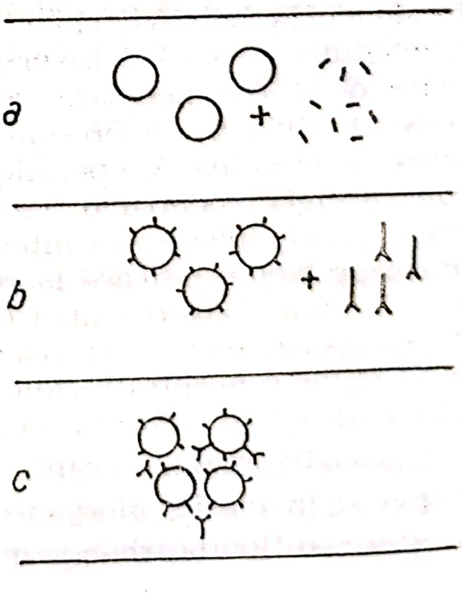


Fig. 15-17 — Schema reacţiei de latexaglutinare pentru detectarea anticorpilor.
a — sensibilizarea latexului cu antigen viral ; b — reacţia dintre latexul sensibilizat şi anticorpii corespunzători ; c — exprimarea latexaglutinării ; ○ — particulă latex ; ═ — antigen ; λ — anticorp.

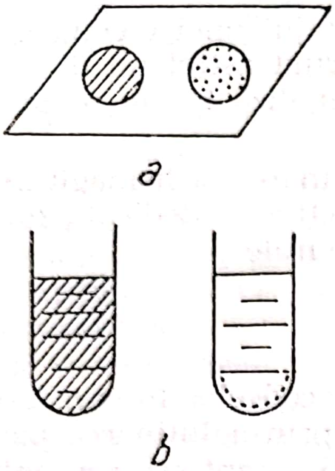


Fig. 15-18 — Reacție de latexaglutinare (LA). *a* — LA pe lamă ; *b* — LA în eprubetă.

Reacția de latexaglutinare se efectuează cel mai frecvent pe lamă, dar uneori se pot folosi și eprubetele, mai ales atunci cînd sînt necesare determinări (semi) cantitative (fig. 15—18).

În varianta LA pe lamă, picături egale ca mărime se depun succesiv și se amestecă pe o suprafață cam de 1 cm diametru (unele truse se furnizează cu lame speciale cu godeuri și eventual cu fond întunecat) și în cazul unei reacții pozitive, în decurs de cîteva minute, se formează aglutinate decelabile cu ochiul liber.

În eprubete, LA constă din amestecarea unor volume egale din materialul examinat și suspensia de latex sensibilizat, cu incubare ulterioară la 37—56°C, cîteva ore, și apoi menținere la 4°C pînă a doua zi, cînd eventual eprubetele se centrifughează ușor (2—5 minute la 700×*g* ; față de suspensia omogenă, opalescentă, prezentă în eprubetele de control sau în cazul rezultatului negativ, cel pozitiv apare ca o depunere „în umbrelă“ a grunjilor formați, pe fundul eprubetei.

În laboratoarele de virusologie, LA s-a preconizat pentru detectarea unor antigene virale în probe recoltate de la bolnavi (de exemplu, AgHBs, antigen rotaviral etc.), ca și, mai recent, pentru determinarea anticorpilor și a statusului imun în rubeolă. Sensibilitatea LA se dovedește foarte ridicată : de exemplu, în cazul detectării virusurilor rota în extracte de fecale de la bolnavi, chiar dacă nu realizează sensibilitatea reacției de hemaglutinare pasivă inversă, LA evidențiază antigenul la o diluție mai mare decît cea necesară pentru electronomicroscopie. Pentru mărirea sensibilității LA s-a preconizat îmbrăcarea prealabilă a particulelor de latex cu proteină A, operație menită să permită fixarea mai bună a anticorpilor IgG ; pentru o legare mai bună a antigenului HIV, Fucillo și colab. (1987) folosesc ca intermediar sistemul avidină — biotină. De notat unele probleme pe care le ridică LA : stabilitatea preparatelor sensibilizate impune folosirea unei diluții critice a reactantului sensibilizant. Pe de altă parte, efectuarea reacției cu anumite probe (urină, LCR etc.), care pot conține concentrații ridicate de proteine, duce la obținerea unor rezultate nespecifice și face necesară o prelucrare suplimentară (de exemplu, termoinactivarea) ; folosind truse latex pentru detectarea antigenului rotaviral în fecale, Morgan-Capner (1987) preconizează o extragere a acestora cu fluorocarbon pentru eliminarea reacțiilor nespecifice.

În prezent, se comercializează truse pentru efectuarea LA în unele infecții virale; în special pentru infecțiile rotavirale procedeul apare indicat, dat fiind accesibilitatea sa la patul bolnavului.

15.3.8.2. *Hemaglutinarea pasivă (HAP)*

Hemaglutinarea pasivă are poate cea mai mare răspîndire dintre toate reacțiile de aglutinare pe suport; dintre numeroasele suporturi folosite hematiile au dovedit capacitatea de a lega constant anumite substanțe și de a se comporta uniform în condiții controlabile.

Reacția-prototip de hemaglutinare pasivă folosește hematii sensibilizate (îmbrăcate) cu antigen; în prezența anticorpilor corespunzători se realizează o reacție antigen — anticorp care, de obicei nesesizabilă cu ochiul liber, se manifestă prin aglutinarea hematiilor antrenate în complexele formate de către anticorpi și antigenul pe care îl au la suprafață; în varianta cunoscută sub denumirea de *hemaglutinare pasivă inversă* (HAPI) anticorpii sînt cei care se află pe hematiile care exprimă, printr-o aglutinare a lor, reacția imunologică corespunzătoare în prezența antigenului respectiv. În controlul specificității reacțiilor de hemaglutinare pasivă se efectuează o probă de blocare cu antigenul sau anticorpul presupus a fi identificat; această probă de blocare poate fi transformată într-o variantă curentă de HAP pentru detectarea antigenelor.

În realizarea reacțiilor HAP intervin diferiți factori:

— Referitor la hematiile folosite pentru HAP constatăm că în laboratorul de virusologie, pe lîngă hematiile standard — hematii de berbec sau cele de om — există situații în care se pot utiliza chiar unele asupra cărora virusul respectiv acționează direct și le aglutinează (de exemplu, hematii de gîscă îmbrăcate cu antigene arbovirale); se presupune că în acest mod antigenul are o capacitate mult mai mare de fixare pe hematie, dar virusurile care eluează de pe hematii trebuie legate prin alte procedee mai complicate.

— După ce Boyden (1958) a preconizat procedeul, în HAP s-au folosit hematii proaspete susceptibile a fixa antigene diferite atît direct, cît mai ales după o prelucrare necesară pentru sensibilizarea cu anumite antigene; tanarea s-a dovedit un procedeu capabil să dezvelească anumite structuri din membrana hematiilor pentru a le face accesibile antigenelor, rămînînd chiar și astăzi în uz. Totuși, în cazul anumitor antigene, ca și pentru sensibilizare cu anticorpi, au fost recomandate și alte modalități ce favorizează legarea lor la hematii (de exemplu, tratare cu Cl_3Cr sau cu bis-diazobenzidină).

Hematiile sensibilizate numai în aceste modalități nu se pot păstra însă decît cîteva zile după care se hemolizează.

Preparate stabile au fost obținute prin tratarea hematiilor cu diferiți reactivi, precum: formolul, aldehida piruvică, aldehida glutarică, acroleina etc.; hematiile astfel stabilizate sînt apoi sensibilizate fie direct, fie cu ajutorul acidului tanic, Cl_3Cr sau bis-diazotare. Hematiile stabilizate și sensibilizate se păstrează vreme îndelungată la rece (chiar ani), pot fi congelate și chiar liofilizate fără a-și pierde proprietățile. În prealabil, pentru păstrare, hematiile stabilizate şi sensibilizate se resuspendă într-o soluţie care conţine ser de iepure normal, albumină bovină sau gelatină 0,1%.

Iniţial, laboratorul de virusologie a apelat la procedeul HAP pentru examene serologice folosind hematii sensibilizate cu antigene virale; eficienţa sensibilizării s-a dovedit a fi în funcţie de activitatea antigenului respectiv, iar la aceeaşi capacitate antigenică — în funcţie de gradul său de purificare.

Determinarea diluţiei optime de antigen viral pentru sensibilizarea hematiilor se face prin reacţii „în tablă de şah" (hematii sensibilizate cu diferite diluţii de antigen, puse în reacţie cu diluţii seriate din serul imun). Sensibilizarea cu fiecare antigen reuşeşte mai bine în cazul unor hematii stabilizate printr-un anumit procedeu decît prin altul.

Sensibilizarea hematiilor pentru reacţia HAPI se face mai puţin cu seruri imune ca atare, cît mai ales cu preparate globulinice obţinute din astfel de seruri; probleme apar în cazul anumitor modalităţi de tratare a hematiilor, consecutiv cărora se poate pierde din activitatea specifică a anticorpilor, deşi proprietăţile antigenice li se păstrează.

Noskov apreciază că tratarea formol — acid tanic face ca imunoglobulinele serice să blocheze sau să ecraneze funcţia anticorp. Goldwasser (1980) foloseşte pentru cuplare 2,4-tolilenizocianat şi obţine preparate cu reactivitatea specifică foarte bine păstrată.

— Reacţiile de HAP şi HAPI se efectuează în eprubete sau în plăci cu godeuri, în varianta obişnuită sau într-una cu volume reduse de reactanţi (0,025 mL); diluantul conţine şi o proteină stabilizatoare (ser de iepure normal sau albumină bovină). Determinarea nivelului anticorpilor foloseşte diluţii din serul investigat la care se adaugă volum egal de hematii sensibilizate, concentraţia lor fiind de 0,5% pînă la 2% în funcţie de antigen şi condiţiile de sensibilizare. În cazul HAPI stabilirea prezenţei antigenului se face calitativ, la o anumită diluţie din proba examinată adăugîndu-se un volum egal de suspensie de hematii sensibilizate cu anticorpi; eventual, şi concentraţia antigenului poate fi apreciată, HAPI efectuîndu-se cu diluţii ale acestuia.

— Serurile investigate — ca şi serul de iepure din diluant — trebuie în prealabil adsorbite pe hematiile corespunzătoare preparatului spre a elimina heteroaglutininele; această prelucrare se evită dacă în investigaţia serologică se introduc preparate antigenice cu hematii de om OI, Rh (—).

— Reacţia HAPI cu scopul detectării unui antigen în materiale recoltate de la bolnav se poate solda cu rezultate neconcludente atunci cînd au o încărcătură proteică mare (sînge, ca şi suspensii de organe), aceasta provocînd aglutinări nespecifice prin instabilitatea pe care o cauzează ca şi prin eventualele heteroaglutinine.

Nikolaev (1975) remarcă faptul că folosirea ca diluant a unei soluţii hipertonice elimină reacţiile nespecifice date de suspensia de creier de şoarece atunci cînd se caută antigenul arboviral.

Blocarea HAP foloseşte pentru detectarea antigenului viral un sistem în care ambii reactanţi sînt cunoscuţi: hematii sensibilizate cu antigen şi un ser imun corespunzător la o diluţie convenabilă (de exemplu, de 2—4 ori mai concentrat decît diluția-limită care mai produce o hemaglutinare specifică) (Ungureanu și Strati, 1982 ; Black, 1983).

În eprubetele sau godeurile plăcii se pun în contact volume egale din materialul ce se examinează și diluția de lucru a serului imun, iar după perioada de incubare necesară se adaugă hematiile sensibilizate cu antigenul corespunzător ; prezența antigenului în probă se traduce prin absența hemaglutinării, spre deosebire de proba de control în care materialul suspectat se înlocuiește cu diluant. Aprecierea cantității de antigen se poate face printr-o reacție de blocare cu diluții seriate din materialul respectiv, ca și prin stabilirea titrului serului imun în HAP comparativ cu titrul său, în prezența unei anumite diluții a materialului suspectat. În mod asemănător se efectuează blocarea HAPI. Avînd posibilitatea unui control al specificității și avînd doi parametri cunoscuți, reacția de blocare a HAP (BHAP) dovedește o sensibilitate similară celei realizate de HAPI.

— Toate variantele HAP se desfășoară la 37°C, rezultatele putînd fi evaluate la cîteva ore.

HAP și variantele sale au fost utilizate în numeroase laboratoare dar încă nu au căpătat o generalizare, dat fiind multiplele variabile amintite care fac dificilă o standardizare. Acolo unde local sau regional este posibilă o distribuție centralizată a unor truse pregătite în condiții strict controlate, HAP și variantele sale pot rezolva probleme curente în patologia virală, mai ales că sensibilitatea procedeului este apreciată la nivelul unora de mare difuzie, precum RIA sau RIE ; față de acestea însă HAP are avantajul simplității de execuție și marea ei accesibilitate.

HAP a fost folosită pentru determinări de anticorpi în numeroase sisteme virale, dintre care amintim investigații serologice în infecții cu CMV (Fucillo, 1971 ; Yeager, 1979) și cu virus herpetic (Back, 1974) ca și pentru aprecierea rezultatelor vaccinării antivariolice (Nyerges, 1969 ; Mihăilescu, 1976). De obicei, nivelul anticorpilor detectați prin HAP este mai mare decît cel obținut, de exemplu, prin HAI. Dintre numeroasele utilizări ale HAPI, identificarea unor antigene arbovirale a fost realizată prin examinarea creierului recoltat de la șoarecii inoculați cu virus (Konikova, 1968 ; Nikolaev, 1975), a sîngelui lor (Klisenko, 1980), ca și a culturilor de celule după inoculare (Gaidamovici, 1974) ; Sanekata (1979) detectează rotavirusuri în fecale, specificitatea rezultatelor fiind confirmată prin blocarea HAPI cu ser imun.

15.3.9. REACȚIA DE FIXARE A COMPLEMENTULUI, REACȚIILE DE HEMAGLUTINARE, HEMAGLUTINOINHIBARE ȘI REACȚIA DE NEUTRALIZARE

Aceste procedee imunologice de bază în diagnosticul ca și în cercetarea virusologică, verificate în timp, cu posibilități și limite bine cunoscute, se folosesc în primul rînd pentru identificarea anticorpilor (în evoluția infecției sau după vaccinare), în al doilea rînd pentru identificarea și tipizarea izolatelor virale.

În primul caz, succesiunea și perioada de apariție a anticorpilor implicați în una sau alta dintre aceste reacții ca și persistența lor oferă o imagine imunologică proprie infecției virale în cauză.

Interacțiunea imunologică se adresează unor antigene virale corelate cu anumite activități ale virusului (de exemplu, infectivitatea sau hemaglutinarea) sau cu capacitatea de a forma complexe antigen — anticorp în măsură să fixeze complementul.

Diferențierea anticorpilor se datorează unor factori multipli, printre care tipul de antigen, clonele celulare implicate în elaborarea anticorpilor corespunzători, perioada în care acționează aceste antigene în cursul infecției, ca și fondul imunitar al organismului (infecție primară sau repetată, cu sau fără vaccinare în antecedente). Rezultatele acestor examene serologice, interpretate în ansamblu, permit aprecierea stadiului de boală.

RFC, HA-HAI, RN — procedee imunologice folosite de la începuturile virusologiei — au rămas ca unele de referință pentru aprecierea sensibilității și specificității procedeelor preconizate în ultimele decenii (de exemplu, RIA, RIE, imunohemoliza radială — IHR — etc.).

În unele infecții, aceste procedee considerate clasice sau convenționale contribuie la diagnostic prin recunoașterea antigenului viral chiar în probele recoltate de la bolnav (de exemplu, RFC pentru identificarea antigenului variolic la nivelul leziunilor cutanate, HA-HAI — pentru identificarea antigenelor gripale în spălăturile nazofaringiene).

În privința identificării și tipizării virusurilor izolate, aceste procedee realizează performanțe diferite, în funcție de antigenele și, respectiv, de activitățile virale cărora li se adresează (de exemplu, în domeniul arbovirusurilor, RN poate preciza tipul de virus, în timp ce HAI indică grupul sau subgrupul căruia îi aparține izolatul).

În prezent, pe principiul acestor procedee imunologice de bază au fost imaginate variante cu avantaje tehnice (de exemplu, IHR și fixare de complement în gel, microneutralizare în culturi de celule etc.), căpătînd în același timp valori noi prin adaptarea unor realizări moderne (de exemplu, miniaturizare, citire spectrofotometrică pentru HAI sau RFC, automatizare etc.).

În același timp, aceste procedee s-au dovedit în măsură să susțină noi principii în diagnostic (de exemplu, folosirea lor pentru discriminarea felului anticorpilor din clase diferite de imunoglobuline).

13.3.9.1. *Reacția de fixare a complementului (RFC)*

În cursul infecțiilor virale, de obicei apar anticorpi fixatori de complement față de diferite structuri componente ale agentului viral corespunzător. În mod obișnuit, anticorpii fixatori de complement (FC) apar devreme în cursul bolii, încît prezența lor atestă infecție actuală sau foarte recentă ; în schimb, în anumite infecții localizate la nivel SNC (de exemplu, infecție poliomielitică sau cea cu virusul coriomeningitei limfocitare), anticorpii FC apar tardiv.

În mod corespunzător, antigene FC pot fi găsite la nivelul unor secreții, excrete (urină, fecale), la nivelul unor țesuturi sau organe, în sînge și pot fi corelate cu infecția investigată, fără ca titrul lor să fie în corelație cu cantitatea de virus infectant.

Evidențierea anticorpilor sau a antigenelor FC se realizează prin reacția cunoscută sub numele de reacția de fixare a complementului în care o primă etapă, de formare a complexului antigen — anticorp cu fixarea la acesta a complementului, este urmată de o a doua etapă, de evidențiere a fenomenului cu ajutorul unui sistem indicator ; sistemul indicator este constituit din hematii sensibilizate cu anticorpii corespunzători, reprezentînd așa-numitul sistem hemolitic. Dacă în prima etapă s-au format complexe specifice care l-au fixat, lipsa complementului face ca în etapa a doua hematiile să nu fie afectate ; lipsa corespondenței între antigenul și anticorpii participanți la prima etapă lasă liber complementul, care, fixat de hematiile sensibilizate, se activează și declanșează liza lor.

RFC implică numeroase componente :

— În cazul investigării materialelor provenind de la bolnav, alături de antigenele virale se găsesc componente organice, mai ales de natură proteică, cu capacitatea de a lega complementul în afara oricărei interacțiuni antigen — anticorp ; pentru înlăturarea acestei *activități anticomplementare* s-au preconizat anumite prelucrări care complică procedeul, adesea fără vreun rezultat.

— În cazul investigării serurilor pentru decelarea anticorpilor FC se pune, pe de o parte, problema preparatului antigenic necesar reacției iar, pe de altă parte, însăși serurile complică situația prin activitatea anticomplementară și prin cea hemolitică față de hematiile de berbec utilizate de regulă în sistemul hemolitic.

Preparatele antigenice sînt obținute din materiale recoltate de la animale inoculate cu virus (organe, țesuturi, sînge), de la ouă embrionate după inocularea corespunzătoare a virusului (membrane sau lichide embrionare, suspensie din fragmente de embrion) sau de la culturi de celule ; în mod deosebit, primele două surse de antigen conțin și alți componenți cu activitate anticomplementară sau hemolitică, precum și unii care conduc la rezultate nespecifice. Această situație face necesară purificarea preparatelor (de exemplu, extracția cu zaharoză — acetonă a antigenului arboviral din creierul șoarecilor inoculați), eventual și concentrarea lor. Culturile celulare întreținute cu medii sintetice oferă produse mai purificate, adesea fără activitate anticomplementară.

Serurile care se investighează prin RFC suferă tratamente menite să elimine activitatea anticomplementară, pe cea hemolitică precum și complementul propriu, datorită căruia s-ar obține rezultate fals negative (inactivare termică, adsorbție pe caolin sau pe pulbere de ficat, adsorbție de hematii de berbec).

Complementul (ser de cobai proaspăt recoltat sau conservat — prin liofilizare sau în mediu hipertonic, după Richardson) se folosește în RFC la o concentrație anumită (1,2—2 unități) după o prealabilă determinare a activității sale ; pregătirea sistemului hemolitic din hematii și diluții adecvate de hemolizină necesită de asemenea determinări adecvate.

În principiu, indiferent de varianta tehnică folosită, reacția de fixare a complementului implică determinări prealabile ale activității antigenului, serului imun (în cazul efectuării identificării de antigene), a serului hemolitic și a complementului, precum și pregătirea unei suspensii standard de hematii.

Într-o primă etapă, antigenul în doza pregătită se pune în contact cu serul ca atare sau în diluții în vederea realizării interacțiunii antigen — anticorpi ; în funcție de tehnica folosită, durata contactului poate fi de o oră la 37°C (legare mai rapidă dar uneori incompletă a complementului), dar, mai ales în cazul virusurilor, amestecul este ținut peste noapte la +4°C (legare completă a complementului, deși uneori activitatea anticomplementară a antigenului sau a serului devine și ea mai evidentă). În etapa secundară, amestecului i se adaugă hematiile sensibilizate cu anticorpi (sistemul hemolitic) ca un complex antigen — anticorp indicator, după care se incubează la 37°C, temperatură favorabilă exprimării acțiunii complementului rămas nelegat în prima etapă și reținut apoi de hematiile sensibilizate ; hemoliza înseamnă absența complexelor imune specifice sistemului viral investigat, deci rezultat negativ al reacției de fixare a complementului, în timp ce absența hemolizei, care atestă fixarea complementului de către complexul antigen — anticorp format în prima etapă, înseamnă reacție de fixare a complementului pozitivă.

Aprecierea rezultatului se face cu ajutorul unor etaloane special pregătite spre a indica diferite grade de hemoliză, atît cu ochiul liber, cît și cu ajutorul spectrofotometrului.

Există elaborate numeroase variante tehnice pentru efectuarea RFC în diagnosticul serologic al infecțiilor virale, în care se folosesc volume diferite ale reactanților, modalități diferite de sensibilizare a hematiilor, complement în doze diferite, durată și temperatură de incubare a primei etape diferite etc. ; există de asemenea posibilitatea stabilirii kineticii reacției de fixare a complementului.

În prezent, introducerea plăcilor cu godeuri a ameliorat condițiile de realizare a RFC ; la Institutul de Virusologie se utilizează o micrometodă (volume de 0,1 mL pentru fiecare reactant — antigen, ser, complement, sistem hemolitic), cu fixare peste noapte la rece, complementul dozîndu-se după titrare la 2,5 unități, suspensia de hematii 4% fiind controlată fotometric etc.

Titrul fixator al serului este reprezentat de cea mai mare diluție care realizează o fixare de complement pozitivă 50% (++) (Niculescu și Crețescu, 1985).

RFC este un procedeu relativ simplu și poate servi la examinarea unui număr mare de probe simultan, odată ce toate determinările prealabile au fost efectuate ; apare astfel ca una din reacțiile cele mai bine standardizate.

Problema importantă este aceea a preparării antigenelor specifice stabile și fără activitate anticomplementară.

Unele virusuri au două tipuri de antigene fixatoare de complement ; așa cum exemplifică virusul urlian, la care există un antigen asociat cu particula virală (antigen V) și un antigen care poate fi separat de particula virală, solubil, cu dimensiuni mai reduse (antigen S). Anticorpii corespunzători au perioade diferite de apariție în cursul infecției ; anticorpii față de antigenul S se pot decela chiar din primele zile de boală și adesea nivelul lor atinge un maxim înainte de apariția anticorpilor față de antigenul corpuscular V. Dacă la începutul convalescenței ambele tipuri de anticorpi se găsesc la nivel ridicat, cei S scad rapid iar anticorpii de tip V rămîn ca indicatori ai infecției produse o perioadă mai îndelungată. Folosind RFC la intervale judicios alese în cursul infecției în cauză, se poate înregistra seroconversia cu semnificație diagnostică.

RFC nu răspunde convenabil atunci cînd este vorba de infecții clinic inaparente ca și, uneori, la bolnavii tineri ; de asemenea, se pare că prin RFC anticorpi de tip IgM nu pot fi detectați la fel de bine ca prin alte procedee.

Din punct de vedere epidemiologic, investigarea colectivității față de anumite infecții virale nu este indicată prin RFC, tocmai datorită particularităților amintite (anticorpi de scurtă prezență sau absenți în infecțiile inaparente).

În schimb, RFC ajută la identificarea virusului și a antigenelor sale în cursul infecției și permite stabilirea rapidă a grupului de virusuri căruia îi aparține izolatul ; de asemenea, procedeul poate asigura în anumite cazuri stabilirea diferențelor dintre virusuri. RFC are utilizare preferențială în anumite infecții virale ; astfel, în cazul enterovirusurilor, RFC folosește reactanți de grup, la fel ca și în cazul infecțiilor cu adenovirusuri ; de asemenea, investigația serologică adresată unor infecții virale se realizează cu precădere prin RFC (infecții cu virus herpetic, respirator sincițial, citomegalic, paragripal 3 etc.).

Fixarea complementului, ca principiu pentru identificarea complexelor imune specifice realizate de anticorpii prezenți în serul bolnavilor, are și posibilități de exprimare prin efectuarea altor procedee :

— În imunofluorescență, ca și în examenul prin tehnica imunoperoxidazică, există variante în care, după tratarea frotiurilor cu seruri, urmează o etapă de tratare cu complement și apoi cu un conjugat adresat acestuia din urmă ; varianta se aplică de altfel și în examinarea celulelor din materialul de la bolnav, dat fiind simplificarea procedeului prin adăugarea complementului, necesitînd un singur fel de conjugat pentru examinarea serurilor provenind de la specii diferite, și anume conjugat antiglobulină de cobai.

— În mod similar, pentru procedeele în fază solidă de detectare a anticorpilor (RIA, RIE, FIA) s-au preconizat tehnici în care intervine fixarea complementului.

— Cu elemente împrumutate de la procedee diferite apare varianta indicată de Haaheim (1977) și Yamane (1983) pentru identificarea anticorpilor față de virusul gripal : fixarea complementului prin difuzie radială simplă. Antigenul S gripal este înglobat în agaroză ; în stratul de gel se fac găuri și în acestea se introduc diluții de ser, lăsîndu-se apoi preparatul la +4°C pentru difuzie radială a anticorpilor, după care la suprafața gelului se adaugă complement. Sistemul hemolitic înglobat la rîndul său în agaroză se toarnă deasupra primului strat de gel, se lasă să se solidifice și se păstrează totul la termostat. Rezultatul se exprimă ca zone circulare în jurul găurilor, în care hematiile sînt intacte, în timp ce în restul stratului de agaroză se produce hemoliza completă a lor ; dimensiunile ariei de hemoliză sînt proporționale cu nivelul anticorpilor din ser.

15.3.9.2. Hemaglutinarea (HA) și hemaglutinoinhibarea (HAI)

Unele virusuri pot fi recunoscute prin capacitatea lor de a provoca aglutinarea hematiilor ; hemaglutinarea produsă se datorează unei componente aflate fie la nivelul învelișului (de exemplu, myxo- și paramyxovirusuri, togavirusuri), fie în structura capsidei (de exemplu, reovirusuri). Uneori, această componentă — hemaglutinina — poate trece din structura virionului în mediul înconjurător (de exemplu, poxvirusuri).

Prezența activității hemaglutinante într-un anumit material poate sugera prezența unui virus cu această proprietate (de exemplu, spălătura nazofaringiană în cazul infecției gripale la om) fără însă a o identifica ; frecvent însă există activități hemaglutinante proprii substratului de replicare a virusului (de exemplu, membrana corioalantoidiană), ceea ce induce în eroare cînd se verifică izolarea virusului pe acest substrat. De aceea, totdeauna, din probele recoltate de la bolnav sau din substraturile biologice de cultivare, activitatea hemaglutinantă trebuie identificată printr-o reacție imunologică de inhibare — reacția de hemaglutinoinhibare.

În mod curent însă reacția de hemaglutinoinhibare se folosește pentru decelarea anticorpilor corespunzători hemaglutininei proprii virusului suspectat în infecția investigată, fiind unul din cele mai utilizate procedee de investigare în virusologie.

În privința hemaglutinării virale trebuie cunoscute anumite aspecte :

— Determinarea structurii chimice a unor hemaglutinine (de exemplu, glicoproteine la virusuri gripale, lipoproteine la cele pox) a favorizat purificarea lor în vederea folosirii ca reactant pentru reacția de hemaglutinoinhibare.

— Hemaglutinarea se realizează cu hematii provenind de la specii diferite, în funcție de virusul în cauză (tabelul 15—XVIII) ; în plus, capacitatea hemaglutinantă a unor virusuri se exprimă adesea în condiții stricte de pH și temperatură, condiții prin care se poate chiar realiza diferențierea agenților respectivi (de exemplu, arbovirusurile).

— În privința hematiilor, pe lîngă spectrul diferit de acțiune pe care îl are un anumit virus asupra hematiilor ce provin de la diferite specii (tabelul 15—XIX), uneori acesta este diferit în funcție de vîrsta sursei (de exemplu, unele poxvirusuri cer hematii de la păsări adulte, altele pe cele de la pui de o zi) ; același virus aglutinează diferit hematii provenind de la indivizi din aceeași specie (de exemplu, titruri hemaglutinante deosebite ale aceluiași antigen urlian în prezența hematiilor de la diferiți cocoși), după cum îmbătrînirea și recoltările prea frecvente de la același individ conduc la scăderea sensibilității hematiilor și, respectiv, un titru mai redus în reacția de hemaglutinare.

Hematiile de om OI, Rh (—) simplifică procedeul, pentru că nu mai este necesară adsorbția prealabilă a serurilor pe hematiile ce urmează a fi folosite în reacția HAI ; sensibilitatea mai scăzută față de anumite virusuri (de exemplu, arbovirusuri) poate fi ameliorată prin tratarea lor cu tripsină.

În fine, dificultățile aprovizionării cu anumite hematii (de exemplu, hematii de maimuță, de gîscă sau de pui de o zi) au fost depășite prin introducerea hematiilor stabilizate prin variate procedee (de exemplu, *TABELUL 15-XVIII*

Hemaglutinarea determinată de unele virusuri
(după Mayr şi colab., 1977)

Virusuri	Hematii	pH	Temperatură
v. gripal	cocoş, cobai	7,2	22°C (tipul A şi B) ; 4°C (tipul C)
v. paragripale	cocoş, cobai	6,8—7,2	4°C ; 22°C sau 37°C (hematii cobai)
v. urlian	cocoş, cobai	6,8	22°C ; 37°C (hematii cobai)
v. rujeolic	maimuţă (*Rhesus*)	7,2	37°C
v. rubeolic	gîscă, porumbel, pui de o zi	6,2	4°C ; 22°C
v. REO 1—4	om OI	6—8	4° ; 37°C
v. ECHO	om OI	7—8	diferit, 4°C şi 37°C
v. Coxsackie	om OI	7—8	diferit, 4°C şi 37°C
Coxsackie B7	cocoş		
v. arbo	gîscă, pui de o zi	diferit 6,2—7	4°C ; 22°C ; 37°C
v. corona	şobolan, şoarece, cocoş, om, maimuţă	7 7	4°C ; 37°C 4°C
v. adeno	maimuţă, şobolan, om	7—8	22°C ; 37°C
v. pox	cocoş	7,2	37°C
v. rabic	gîscă	6,2	4°C

TABELUL 15-XIX

Susceptibilitatea hematiilor provenind de la diferite specii faţă de activitatea arbovirusurilor

Hematii de:	Nivelul susceptibilităţii
gîscă	+++
pui de găină de o zi	+++
om	+/±
cobai	+/±
cocoş	+/±

formol, glutaraldehidă, acroleină etc.) deşi, uneori, procesul poate determina o afectare a receptorilor hematici (Lang şi Wiegand, 1983) ; avantajul lor constă şi în posibilitatea folosirii pentru adsorbţia serurilor ce se examinează (îndepărtarea izoaglutininelor) (tabelul 15—XX).

— Hemaglutinina acţionează la nivelul unor receptori hematici, uneori accesibili direct, alteori numai după prelucrare adecvată (de exemplu, tripsinizare). După hemaglutinare, unele virusuri pot fi desprinse de pe hematii ; în funcţie de temperatură, myxovirusurile eluează, lăsînd hematiile afectate de către neuraminidază, încît ele nu mai pot fi aglutinate de acelaşi virus ci numai de altele, conform unui gradient anume, în timp ce eluarea altor virusuri nu afectează în mod similar receptorii celulari.

TABELUL 15-XX

Utilizări ale hematiilor conservate în diagnosticul unor infecții virale prin HA-HAI

Sistem viral	Hematii folosite	Mod de conservare	Indicații bibliografice
v. rubeolic	berbec, om	formol	Gupta (1970) ; Pugliese (1979)
v. arbo	cocoș, gîscă	formol, glutaraldehidă	Kiriusenko (1970) ; Wolff (1975) ; Ito (1980)
v. gripale	cocoș	formol	Cox (1956) ; Schmidt (1959)

Imaginea hemaglutinării virale este caracteristică : hematiile se aglomerează, formează grunji, care se depun pe fundul eprubetei sau al godeului sub aspectul descris de „umbrelă", în timp ce martorii de hematii se depun ca un buton sau inel bine delimitat ; de obicei, imaginea aglutinării hematiilor de către virusuri diferă de cea produsă de către izoaglutinine. Concentrația hematiilor reprezintă un factor critic : în concentrație slabă, hematiile sedimentează lent sau deloc iar dacă sînt prea concentrate se depun rapid cu o imagine necaracteristică, greu de interpretat. În funcție de sistemul viral și de proveniența hematiilor se recomandă concentrații adecvate (de exemplu, 0,5% hematii de pasăre, dar 0,4% pentru cele de om).

În practică, rezultatul hemaglutinării se notează de la una totală (++++) pînă la cea negativă (—), cu intensități intermediare ; o unitate (UHA) este reprezentată de cea mai mare diluție a antigenului care mai produce o hemaglutinare totală ; au fost preconizate aprecieri spectrofotometrice pe baza unor principii de fizică.

Hemaglutinarea este împiedicată de către anticorpii corespunzători antigenului hemaglutinant ; într-o primă etapă se realizează interacțiunea antigen — anticorp (30—90 de minute), pentru ca, în continuare, amestecului să i se adauge suspensia de hematii, rezultatul fiind apreciat după alte 30—90 de minute. Spre deosebire de aspectul înregistrat cu ocazia efectuării hemaglutinării (aglutinare totală în primele eprubete, cu modificarea progresivă a aspectului, pînă la cel de „buton", la diluții mari de antigen), în reacția de hemaglutinoinhibare în primele eprubete hematiile se depun, pentru ca, odată cu reducerea anticorpilor la diluțiile mari de ser, să apară aglutinarea tipică „în umbrelă", pînă la care se notează și aspectele intermediare ; martorul — antigen hemaglutinant la diluția de lucru — oferă imaginea caracteristică „în umbrelă".

Reacția de hemaglutinoinhibare se folosește în mod obișnuit pentru punerea în evidență a anticorpilor ce apar ca răspuns al organismului la infecția virală sau după vaccinare, precum și anticorpii formați la animale imunizate în scopul preparării serurilor imune (de diagnostic sau terapeutice) ; în anumite sisteme virale (de exemplu, arbovirusuri) inhibarea hemaglutinării reprezintă procedeul de predilecție pentru identificarea unui izolat viral care a manifestat activitate hemaglutinantă.

HAI este poate cea mai răspîndită modalitate de investigare serologică, dat fiind relativa sa simplitate și deci accesibilitate în comparație cu celelalte procedee serologice „clasice" — fixarea de complement sau neutralizarea —, chiar dacă are un grad mai redus de specificitate și adesea răspunde și cu virusuri înrudite.

În general — ținînd seama de momentul apariției activității hemaglutinoinhibante în cursul infecției, ca și de persistența acestei activități — se apreciază că HAI permite înregistrarea seroconversiei chiar la bolnavii care ajung să fie investigați relativ tîrziu ; de asemenea, HAI pare indicată în mod deosebit pentru investigații seroepidemiologice menite să stabilească prevalența anumitor infecții virale într-o colectivitate.

În privința reacției HAI sînt de reținut unele aspecte :

— În funcție de sistemul viral investigat, HAI trebuie să fie efectuată în condițiile cerute de activitatea hemaglutinantă proprie (diluant și pH-ul acestuia, tip de hematii, temperatură).

— Aceleași probleme ca și pentru hemaglutinare : se folosesc hematii proaspete în intervalul de două săptămîni de la recoltare sau hematii stabilizate ; în cazul unor hematii cu o sensibilitate mai redusă se face o eventuală tratare cu tripsină (tabelul 15-XXI) ; folosirea hematiilor de om OI, Rh (—) scutește de a mai adsorbi serurile pe hematii.

TABELUL 15-XXI

Rezultate de reacții HA în sistemul arboviral cu hematii tratate cu tripsină

Antigen arboviral	Titruri HA ale antigenelor în cazul folosirii hematiilor de :		
	gîscă (netratate)	om	
		netratate	tratate
Chikungunya	40/80/80*	—/—/—	80/80/80
Encefalită de căpușă	320/320/320	—/—/—	40/80/160
Encefalită japoneză	160/640/40	40/160/20	160/640/40

* Rezultate ale determinărilor la 3 preparate antigenice.

— În afară de izoaglutinine, se pune problema îndepărtării inhibitorilor nespecifici din serurile examinate : aceștia realizează — chiar în absența anticorpilor specifici hemaglutininei virale — o blocare a hemaglutinării, simulînd un răspuns umoral pozitiv. De obicei, inhibitorii fac parte dintre componentele lipoproteice ale serului (componenta beta intervine cel mai frecvent), adesea fiind identificate multiple activități față de virusuri din aceeași familie (de exemplu, față de myxovirusuri — inhibitorii alfa, beta, gamma și C). Inhibitorii se îndepărtează prin tratare adecvată a serurilor în funcție de cei care acționează în sistemul viral respectiv.

— În cazul investigării serologice prin două probe consecutive la interval adecvat, trebuie să se țină seama că, în condiții necorespunzătoare de păstrare a primei probe, anticorpii hemaglutinoinhibanți pe care aceasta îi conține pot fi afectați, încît în reacția HAI apare o (falsă) creștere de titru la proba a doua, ce induce în eroare.

— Tratarea serurilor în diferite scopuri afectează uneori rezultatul reacției HAI ; tratarea cu 2-mercaptoetanol pentru distrugerea anticorpilor din clasa IgM poate lăsa în ser reactiv care afectează ulterior antigenul hemaglutinant și conduce la rezultate paradoxale (titrul HAI crește în loc să scadă), ceea ce obligă la verificări prealabile și eventual la prelucrări pentru îndepărtare (de exemplu, dializă) ; de asemenea, unele metode de îndepărtare a inhibitorilor nespecifici realizează și o scădere a titrului hemaglutinant, în mod deosebit anticorpii de tip IgM fiind eliminați (tratarea cu caolin, DEAE-Sephadex etc.).

— În fine, atît pentru reacția HA, cît și pentru cea HAI, dacă astăzi se mai utilizează metodologia indicată inițial cu volume relativ mari de reactanți, activitatea laboratorului se ameliorează prin adoptarea tehnicilor în microplăci cu godeuri (de exemplu, cele de tip Takatsy) ; în această metodologie mult simplificată s-a demonstrat însă că titrurile înregistrate, deși corelează în general cu cele ale macrometodelor obișnuite (mai ales în stabilirea conversiei serologice în probe duble), sînt totuși mai reduse.

— Ca și în cazul determinărilor prin reacții de neutralizare, rezultatele HAI se amplifică prin adăugarea în reacție a serului antiglobulinic față de proteinele umane.

— De asemenea, HAI evidențiază mai bine anticorpi IgM atunci cînd pentru reacția antigen — anticorp se preferă menținerea la rece peste noapte (Kalainen, 1974 ; Pattison, 1975).

15.3.9.3. *Reacția de neutralizare (RN)*

Așa cum arată denumirea sa, în această reacție activitatea infectantă a unui virus este neutralizată de anticorpii corespunzători, astfel încît la inocularea amestecului virus — ser imun în sisteme biologice sensibile (animale, ouă embrionate sau culturi de celule), infecția corespunzătoare nu se mai dezvoltă. Cel mai frecvent, reacția de neutralizare se folosește în laborator pentru identificarea și cuantificarea anticorpilor neutralizanți în serurile provenind de la bolnavi ; reacția este necesară uneori pentru identificarea unor izolate virale. Deși complicată ca execuție, costisitoare și de durată, reacția de neutralizare se impune în anumite situații datorită persistenței anticorpilor cu astfel de activitate (uneori mai mulți ani), dar, mai ales, datorită înaltului grad de specificitate pe care îl manifestă (de exemplu, în serologia și identificarea izolatelor arbovirale RN reușește să diferențieze virusuri din aceeași grupă, pentru care reacțiile de fixare a complementului sau cea de hemaglutinoinhibare dau rezultate încrucișate). În activitatea antiepidemică, determinarea anticorpilor neutralizanți oferă indicații asupra prezenței unei infecții în colectivitatea respectivă.

În cursul unor infecții virale, apariția anticorpilor neutralizanți este diferită : în infecțiile arbovirale anticorpii neutralizanți (NT) apar devreme, odată cu cei hemaglutinoinhibanți și înaintea celor fixatori de complement ; de asemenea, frecvent în poliomielită ei sînt deja prezenți la internarea în spital ; în meningita produsă de virusul coriomeningitei limfocitare apariția ca și perioada de atingere a nivelului maxim sînt ulterioare celor corespunzătoare pentru anticorpii fixatori de complement.

Deși nu există date similare referitoare la mai multe virusuri, trebuie reținut faptul că, în infecția herpetică primară, detectarea primilor anticorpi NT este dependentă de prezența complementului, anticorpii NT care apar ulterior pierzîndu-și această dependență. Există diferențe și în privința specificității : anticorpii NT apăruți după infecția primară cu virus herpes 1 sînt specifici de tip, dar cei care urmează infecției cu tipul 2 de virus herpetic neutralizează ambele tipuri.

Reacția de neutralizare ține însă numai de blocarea activității virusului care nu este distrus și chiar poate fi eliberat din complexul antigen — anticorp.

Inocularea amestecului virus — anticorp se folosește astăzi în majoritatea cazurilor în culturi de celule ; animalele și ouăle embrionate se mai utilizează numai în cîteva sisteme virale, deși chiar și pentru ele există culturi de celule accesibile. Astfel, șoarecii se inoculează în cazul arbovirusurilor și al virusului rabic, ca și pentru cele Coxsackie A ; iepurii mai pot fi folosiți pentru determinarea anticorpilor față de poxvirusuri, mai ales că se poate investiga neutralizarea leziunilor cutanate după scarificare. Animalele se aleg conform susceptibilității lor, ca și calea de inoculare, care pentru neutralizare nu corespunde neapărat cu cea obișnuită pentru izolare (de exemplu, în neutralizarea arbovirusurilor se preferă calea intraperitoneală, nu cea intracerebrală recunoscută pentru marea sa sensibilitate la izolare). Animalele inoculate se supraveghează o perioadă adecvată, urmărindu-se simptomatologia infecției și mortalitatea ; decesele din prima zi de obicei nu sînt luate în considerare. Standardizarea procedeului cere ca infectivitatea virusului să fie determinată în prealabil, în reacție fiind utilizată o doză letală de 50% anume indicată pentru fiecare sistem viral (10—50—100 DL_{50}), în amestec cu diluții de ser (îndeosebi, pentru investigații serologice). Mai ales pentru identificări de izolate virale există și varianta unei singure diluții de ser cu activitate neutralizantă cunoscută, care se amestecă cu diluții succesive din suspensia virală.

Neutralizarea se exprimă prin proporția animalelor supraviețuitoare comparată cu cea a animalelor neprotejate.

Inocularea pe ouă embrionate a amestecului virus — ser imun folosește căi adecvate exprimării infectivității virusului în cauză. În cazul unor virusuri hemaglutinante (de exemplu, virusuri gripale sau cel urlian), după inocularea pe cale intraamniotică, se determină dacă activitatea hemaglutinantă apare sau nu ; atunci cînd se lucrează cu virusuri herpetice sau cu poxvirusuri, inocularea amestecului se face pe membrana corioalantoidiană și se stabilește gradul reducerii numărului de leziuni caracteristice (*pock*-uri) față de numărul celor apărute pe MCA după inocularea suspensiei de virus ca atare. În folosirea variantei virus în cantitate fixă — ser în diluții pentru inocularea pe MCA, se realizează o doză infectantă care să ducă la formarea unui număr de leziuni izolate, dar suficiente spre a înregistra gradul reducerii lor.

În mod similar, reacția de neutralizare, într-una din variante — seroneutralizare (virus constant și serul în diluții) sau virus-neutralizare (serul constant și virus în diluții) —, se întreprinde în culturi de celule. Ultima variantă este indicată atunci cînd serul are un conținut redus de anticorpi și mai ales pentru tipizarea izolatelor virale. Neutralizarea în culturi de celule tinde să înlocuiască în laborator animalele sau ouăle embrionate; mai ales seroneutralizarea în titrarea serurilor poate apela la culturi de celule deoarece, chiar în cele cu dezvoltare virală inițial dificilă în astfel de sistem biologic, există sau se pot adapta tulpini de virus ca reactant antigenic corespunzător. De exemplu, recent, Robinson (1987) obține o linie celulară foarte permisivă pentru HIV prin transformarea celulelor C_3 de către virus, ajungîndu-se la exprimarea antigenului în 4—6 zile, cu liză mare la 7—9 zile, deci fiind posibilă o seroneutralizare rapidă.

Variantele tehnice ale reacției de neutralizare sînt multiple:

— Culturi de celule în monostrat se inoculează cu amestec virus — ser; de obicei, doza de virus din amestec reprezintă 100 $DICT_{50}$ și se determină în prealabil, iar pentru ser se face un control la concentrația cea mai mare, în vederea decelării unei eventuale toxicități proprii. Rezultatul se apreciază în funcție de apariția sau nu a efectului citopatic.

— În eprubete, dar mai ales în variantele micro realizate în plăci cu godeuri, amestecului virus — diluții de ser i se adaugă, după perioada de incubare necesară neutralizării, suspensia de celule în concentrație calculată ca să asigure formarea monostratului la probele de control. Rezultatul se apreciază fie prin aspectul pe care îl ia dezvoltarea celulelor (formarea sau nu a monostratului, ECP), ca și prin testul de culoare: în culturile protejate, ca și în cele de control (neinoculate), continuarea dezvoltării celulelor și a metabolismului lor duce la metabolizarea glucozei din mediu, scăderea pH-ului și modificarea culorii indicatorului (roșu fenol); celulele distruse prin acțiunea virusului care nu a fost neutralizat duc la menținerea culorii inițiale a mediului. Testul de culoare permite înregistrarea rezultatului fără examenul microscopic al culturii, dar este aplicabil numai la virusuri cu efect citopatic puternic; în cazul altor virusuri, schimbarea culorii nu mai este așa de evidentă, ba chiar se inversează (de exemplu, adenovirusurile au un efect de stimulare a metabolismului celular, astfel încît în culturile neprotejate scăderea pH-ului este mai rapidă ca în cele de control). O modalitate modernă de apreciere a RN în culturi de celule constă în verificarea replicării virusului prin procedee moderne ca IF, RIA, RIE; Harmon (1987) preconizează URMAA (*Universal rapid microneutralization antibody assay*).

În fine, o modalitate de recunoaștere a efectului neutralizant în culturi de celule constă în folosirea hemadsorbției: cultura de celule în care virusul este prezent adsoarbe hematiile din suspensia adăugată după spălarea monostratului; dacă în microplăci godeurile în care s-au cultivat celulele au fundul rotund, această hemadsorbție are o imagine similară celei realizate în obișnuita hemaglutinare.

Tehnicile de microculturi în plăci cu godeuri permit în prezent examinarea unui număr mare de probe simultan și asigură o substanțială economie de materiale.

În cazul virusurilor care formează plaje în culturile acoperite cu un strat de agar, neutralizarea virusurilor se poate exprima fie prin reducerea numărului leziunilor de pe monostrat, asociată cu (sau numai) o micșorare a dimensiunilor lor, fie prin inhibarea formării lor pe o arie anumită.

În prima variantă, monostratul celular realizat pe suprafețe adecvate (cutii de sticlă sau materiale plastice, rotunde, de obicei de 6 cm diametru sau godeuri cu diametrul de 1 cm, în plăci de materiale plastice) se inoculează cu amestecul de virus cu diluții de ser, în care concentrația virusului este astfel calculată încît, în absența anticorpilor, să realizeze plaje în măsură să fie numărate (50—100 de plaje). Reducerea numărului de plaje în culturile inoculate cu amestec virus — ser este apreciată în comparație cu numărul plajelor la martor : se apreciază diluția de ser care determină o reducere de cel puțin 50% a numărului de plaje ; eventual se apreciază și modificări ale dimensiunilor plajelor — modificări ce pot fi singura expresie a interacțiunii specifice virus — ser.

Tot pe baza capacității de a inhiba formarea plajelor se utilizează variante tehnice în care monostratul inoculat cu doza de virus corespunzătoare este apoi acoperit cu un strat de agar, care conține serul imun și proba cu o concentrație suficientă de anticorpi în agar va opri formarea plajelor de către virusul inoculat. Mai avantajoasă apare varianta în care stratul de agar nu conține ser, acesta fiind depus la suprafața lui cu ajutorul unui disc de hîrtie de filtru îmbibat cu ser sau — mai recent — cu ajutorul unei anse de tip Takatsy ce eliberează o cantitate de 5 μL ; eventual, serul se introduce în găuri practicate în agar. Neutralizarea realizată se evidențiază ca arii circulare de cultură intactă pe fondul culturii lezate de virusul inoculat ; dimensiunile ariilor protejate sînt proporționale cu concentrația anticorpilor în diluția respectivă de ser, iar nivelul lor se apreciază cu ajutorul unei curbe standard, întocmită pe baza rezultatelor unor diluții din preparatul imun de control. Mai ales procedeul cu ansă de tip Takatsy este avantajos, pe același monostrat putîndu-se folosi mai multe diluții de ser (Nagy, 1980) ; adăugîndu-se tratări corespunzătoare, este posibilă și determinarea anticorpilor de tip IgM.

În toate variantele de reducere sau inhibare a plajelor, rezultatele se evidențiază după colorarea probelor, fie cu soluție de roșu neutru adăugată ca atare deasupra stratului de agar sau înglobată într-un strat suplimentar de agar, fie cu soluție de fucsină fenicată după fixarea cu formol și îndepărtarea stratului de agar.

15.3.10. IDENTIFICAREA ANTICORPILOR DE TIP IgM ÎN CURSUL DIAGNOSTICULUI SEROLOGIC

La baza acestei metodologii de diagnostic se află constatarea că, în cursul infecțiilor sau consecutiv imunizărilor, apar anticorpi ce aparțin diferitelor clase de imunoglobuline, cu dinamică proprie, în funcție de felul răspunsului imun — primar sau secundar. În mare, tabloul indică în infecțiile primare o apariție precoce a anticorpilor IgM, concomitent dar cel mai adesea precedînd apariția celor de tip IgG ; nivelul anticorpilor IgM crește pînă ce atinge un maximum la 2—3 săptămîni, rămîne staționar încă una sau două săptămîni, pentru ca apoi să scadă pînă la dispariția lor, care se produce în medie pînă la aproximativ 60 de zile după debutul infecției.

Anticorpii de tip IgG au la început un nivel inferior aceluia pe care îl prezintă anticorpii IgM, ulterior însă devin preponderenți și rămîn la nivelul staționar un timp mai îndelungat, pentru ca scăderea lor să fie apoi mult mai lentă, încît pot fi decelați luni și — cu procedee foarte sensibile — chiar ani după desfășurarea infecției virale. Linde (1985) constată că în rubeolă se diferențiază chiar o dinamică proprie a subclaselor IgG, anticorpii IgG3 apărînd precoce și dispărînd rapid, astfel încît la fel ca și anticorpii de tip IgM reprezintă un marker serologic pentru o infecție actuală sau recentă.

Deși numai sporadic, există indicații asupra apariției precoce a anticorpilor de tip IgA, mai ales a celor secretori, fapt pentru care s-a recomandat utilizarea determinării lor pentru diagnostic în unele infecții virale ca în hepatita virală A (Sikular, 1983) sau infecția urliană (Friedman, 1981).

Mai bine studiată și cu o dinamică proprie evidentă și semnificativă, componenta IgM a bagajului de anticorpi constituie astăzi un criteriu obișnuit abordat în cursul diagnosticului serologic, cu atît mai mult cu cît permite, de obicei, și o diferențiere a infecției primare de o reinfectare cu virusuri identice sau înrudite. Unele infecții virale fac apel în mod deosebit la această modalitate diagnostică și menționăm numai pe cea rubeolică la gravide, infecții virale congenitale cu virus herpetic sau citomegalic, ca și hepatita virală — unde determinarea anticorpilor IgM față de diferite componente ale virusului B în context cu persistența eventuală a acestora permite evaluarea stadiului și a evoluției infecției ; și în infecția cu HIV s-a descris o astfel de corelație (Enzenberger, 1988).

În general însă determinarea anticorpilor IgM ameliorează diagnosticul serologic în laboratorul de virusologie, care — efectuîndu-se numai pe o singură probă de sînge recoltată de la bolnav — poate oferi clinicianului sau epidemiologului un răspuns util măsurilor ce se impun în situația respectivă.

Avantajele pe care le are această determinare explică adevărata avalanșă de cercetări și de variante tehnice preconizate, încît laboratorul are la dispoziție de la unele foarte complicate, pînă la cele mai simple și accesibile oricărui nivel de dotare (tabelul 15—XXII).

TABELUL 15-XXII

Modalități de determinare a claselor de imunoglobuline cărora le aparțin anticorpii

Principii	Procedee de efectuare a determinării
Separarea imunoglobulinelor serice și determinări de activitate specifică prin diferite procedee imunologice, în fracțiunile corespunzînd IgG sau IgM (ca atare sau concentrate, eventual *pool*-uri)	— ultracentrifugare — cromatografie Sephadex G200 BioGel A5M DEAE-Sephadex A50 Ultrogel AcA44 AcA22 AcA34
Identificarea anticorpilor IgG sau IgM cu conjugate antiglobulinice	— tehnici de tip indirect clasic (IF, IPO, RIE, RIA, FIA) — tehnici prin captură de IgM specific și identificare cu conjugate direct sau indirect, eventual antigen conjugat PO sau izotopi — antigen pe latex sau adsorbție de hematii de către hemaglutinină
Îndepărtarea unor Ig și controlul celorlalte prin diferite procedee clasice (HAI, RFC, RN) sau moderne (IF, RIE, RIA)	— tratare SPA ; proteină A—Sephadex și determinare serologică directă sau după prelucrări suplimentare (adsorbții specifice, tratare cu 2-ME etc.) — adsorbții cu particule (de sticlă sau latex) îmbrăcate cu seruri anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA — tratare 2-ME

◆

1. Dintre procedeele pentru identificarea IgM specific, cele care se bazează pe ultracentrifugare sau cromatografie pot fi utilizate numai de laboratoare bine dotate, pentru că sînt de durată (de exemplu, ultracentrifugare 18 ore), necesită prelucrări complicate și nu permit examinarea de rutină a unui număr mare de probe. Ultragelurile permit o trecere mai rapidă și deci o regenerare pentru o nouă folosire la intervale mai reduse. În plus, în fracțiunile recoltate după ultracentrifugare sau trecerea pe coloană, anticorpii apar mult diluați, iar dacă fracțiunile care conțin imunoglobulina M se comasează și eventual se concentrează, se constată o contaminare cu alte componente serice — IgG în special.

De remarcat că unele materiale (de exemplu, DEAE-Sephadex A50) pot realiza separări de imunoglobuline chiar și în vrac.

Probele prelucrate prin aceste procedee se examinează apoi prin oricare din tehnicile serologice pe care le are la îndemînă laboratorul.

Dintre aceste tehnici serologice, unele uzuale (HAI, RFC, chiar dubla difuzie) stabilesc rezultatul bazîndu-se pe cunoașterea fracțiunilor examinate ; la aceasta, tehnicile moderne cuprinse în categoria celor care se efectuează în fază solidă și cu anticorpi marcați (RIA, ELISA, IF) adaugă și specificitatea oferită de folosirea unor conjugate monospecifice (conjugate anti-IgM uman sau cele anti-IgG uman) ; ele se efectuează de obicei asupra serului total, fără a mai fi nevoie de a-l fracționa.

2. În principiu, RIA, ELISA, FIA, IF și chiar IME determină anticorpi IgM (ca și pe cei IgG) după schema reacțiilor indirecte (fază solidă cu antigen — ser — conjugat antiglobulinic — substrat) (Meurman, 1982) (fig. 15—19) ; dacă faza solidă în primele reacții este eprubeta, lama sau bila pe care s-a fixat antigenul, pentru IF ea este reprezentată de preparatul antigenic constituit de celulele în frotiu pe lamă iar în IME, de grila îmbrăcată cu antigen viral. Determinarea anticorpilor IgM prin această schemă este grevată, printre altele, de două inconveniente : prezența anticorpilor de tip IgG la nivel ridicat și/sau prezența factorului reumatoid (FR). În prima situație, anticorpii IgG, cu aviditate mai mare, se fixează cu precădere de antigenul de pe faza solidă, împiedică fixarea celor de tip IgM și astfel se realizează o reacție (fals) negativă ; FR prezent se poate fixa pe anticorpii IgG care au reacționat cu antigenul, conjugatul anti-IgM reacționează cu acest FR și se ajunge la un rezultat (fals) pozitiv. Chiar dacă în reacții indirecte conjugatele specifice față de IgM, IgG

I. IF(IPO) :	Preparat cu celule infectate cu virus	+ ac(IgG, IgM) (ser de bolnav)	+ a ac (IgM) (conjugat anti-IgM uman)	→	R : celule cu imunofluorescență
II. RIA, RIE :	fs.ag (fază solidă îmbrăcată cu antigen)	+ ac(IgM)? (ser de bolnav)	+ a*ac(IgM) (conjugat anti-IgM uman marcat cu (^{125}I, PO))	→ fs.ag.ac(IgM).a*ac(IgM)	R : radioactivitate reținută pe faza solidă sau reacție de culoare la adăugarea substratului
III. Reacții prin captură :	fs. anti-μ (fază solidă îmbrăcată cu anticorpi anti-μ uman)	+ ac(IgM) ? (ser de (bolnav)	+ ^{1}ag*	→ fs. anti-μ. ac (IgM)·ag*	R : „
			ag + ^{1}ac*	→ fs. anti-μ·ac(IgM)·ag·ac*	R : „
			ag+ac+a*ac	→ fs.anti-μ·ac(IgM)·ag·ac.a*ac	R : „
			^{2}ag(ha) + hematii	→ fs·anti-μ.ac(IgM)·ag(ha)·^{3}hematii	R : aspect de hemaglutinare „în umbrelă“
			^{4}Lag	→ fs. anti-μ.ac(IgM).Lag	R : depunere „în umbrelă“

---

[1] (ag, ac, a ac)*^{125}I, PO
[2] antigen hemaglutinant
[3] hematii corespunzătoare antigenului hemaglutinant
[4] latex îmbrăcat cu antigen.

Fig. 15-19 — Detectarea anticorpilor IgM în fază solidă.

sau IgA mai au anticorpi și față de alte clase de imunoglobuline, ele nu detectează decît cantități foarte mari din cele heteroloage (McLean, 1980).

Evitarea acestor inconveniente se obține astăzi fie prin modificarea reacției în faza solidă, încît din serul examinat să nu fie reținută decît componenta IgM — reținere demonstrată ulterior prin diferite modalități tehnice —, fie prin eliminarea din ser a imunoglobulinei G ca și a factorului reumatoid.

Reacția în fază solidă modificată pentru procedeele RIA și ELISA, numită „prin captură" cuprinde (Monath, 1984 ; Gut, 1985) : anticorpii anti-IgM (anti-μ) care îmbracă faza solidă, rețin din ser componenta IgM a cărei activitate specifică se evidențiază diferit ; de obicei, după ce anticorpii IgM au fixat antigenul corespunzător se folosesc conjugate adecvate ; eventual, acest antigen este marcat cu izotopi sau enzimă (Krech, 1984) și nu mai este nevoie de conjugate specifice. Interesante apar variantele în care antigenul reținut fiind hemaglutinant, în etapa următoare se folosesc hematii apte pentru a realiza o imagine de hemadsorbție (Denoyel, 1981 ; 1982), ca și aceea în care anticorpii IgM fixează un antigen aflat pe particule de latex, realizîndu-se o imagine similară hemadsorbție.

Eliminarea fracțiunii imunoglobulinice G ca și cea a factorului reumatoid prin adsorbția serurilor cu preparate anti-IgG, precum latex îmbrăcat cu anti-IgG (Krech, 1984), bile de sticlă cu pori controlați îmbrăcate tot cu anti-IgG, stafilococ Cowan I sensibilizat cu ser anti-IgG și respectiv cu IgG agregat (Kimmel, 1982), diferite particule purtînd pe ele IgG și de asemenea stafilococ Cowan I sensibilizat cu IgG.

De exemplu, Federico (1981) adsoarbe serul cu stafilococ Cowan I înainte de RIA în hepatită ; Robertson (1982) sau Sumaya (1982) ameliorează identificarea IgM prin IF adsorbind serurile cu proteină A, dar Torfarson (1982) arată că se pierde astfel și mult IgM iar Fortier (1982) relatează că tehnica este insuficientă pentru ELISA.

3. În ultima categorie de procedee, tratarea serurilor cu 2-ME sau alți compuși asemănători s-a folosit de foarte multă vreme și, chiar dacă are unele neajunsuri, datorită simplității sale, servește și astăzi pentru eliminarea activității anticorpilor IgM [Tokuhisa (1983) în infecția cu orbivirusuri ; Ohkubo (1984) în cea cu virusul encefalitei japoneze] ; aceasta se realizează prin desfacerea legăturilor disulfhidrice slabe ale moleculei IgM la o concentrație finală a reactivului de 0,05—0,2 M ; o concentrație mai mare (0,7 M) duce la desfacerea legăturilor disulfhidrice mai puternice și inactivează din punct de vedere imunologic și molecula de IgG. Activitate similară cu cea a 2-ME au și alți compuși sulfhidrilici (de exemplu, cistein-HCl ditiotreitol etc.).

În practică, unui volum de ser i se adaugă reactivul în cantitatea și concentrația indicată de varianta tehnică aplicată, amestecul fiind apoi incubat la 37°C, timp de 1—2 ore, după care poate fi folosit imediat într-o reacție serologică de rutină (de exemplu HAI) ; astăzi s-a renunțat la dializa consecutivă tratării, așa cum era recomandat mai demult ; ea se practică numai cînd determinarea se face mai tîrziu și, pentru împiedicarea reagregării fragmentelor moleculei IgM, lichidului de dializă i se adaugă iodacetat.

Tratarea cu 2-ME nu are rezultate satisfăcătoare decît atunci cînd anticorpii IgM sînt preponderenţi, încît distrugerea lor să permită o scădere de titru la cel puţin jumătate ; atunci cînd anticorpii IgM nu constituie decît o proporţie redusă în cadrul activităţii specifice investigate, tratarea cu 2-ME nu are un efect sesizabil prin metode obişnuite, ci numai prin unele foarte sensibile, în fază solidă (RIA, ELISA) sau prin IF. În plus, fiecare sistem viral trebuie investigat în prealabil spre a se stabili dacă 2-ME are vreo acţiune nocivă asupra altor reactanţi ce participă la reacţie (de exemplu, 2-ME poate efectua hemaglutinarea virusului rujeolic sau a celui urlian).

În ultima vreme utilizarea 2-ME a devenit mai importantă în procedee în care acţiunea sa este evidentă după o prealabilă îndepărtare a anticorpilor preponderenţi aparţinînd unor alte clase de imunoglobuline, respectiv celor de tip IgG.

În aceeaşi categorie de procedee, ce se bazează pe eliminarea din ser a unei anumite imunoglobuline şi determinarea activităţii specifice restante, se încadrează separarea IgG fie prin fixarea IgG şi deci a anticorpilor corespunzători de către anticorpi anti-IgG cu care au fost îmbrăcate diferite particule — bile de sticlă, latex de polistiren etc. —, fie pe simpla adsorbţie a IgG cu ajutorul proteinei A stafilococice, în peretele bacteriei sau cuplată pe diferite suporturi (de exemplu, Sephadex sau Sepharoză) ; de asemenea, tratarea serurilor cu DEAE-Sephadex A50 izolează IgM în supernatant.

Dintre aceste posibilităţi, varianta cea mai apreciată este aceea în care serul — eventual tratat în prealabil corespunzător pentru îndepărtarea inhibitorilor nespecifici — este adsorbit pe sedimentul unui volum adecvat de stafilococ Cowan I ; operaţiunea se desfăşoară la temperatura camerei, de obicei în 15 minute (deşi interreacţia IgG — proteină A este imediată). După centrifugarea necesară pentru eliminarea componentului bacterian, supernatantul se foloseşte în determinările serologice (de exemplu, HAI, IF, RIA, RIE etc.). Detaliile de realizare a adsorbţiei variază, dar toţi cei care le recomandă ţin seama de capacitatea de legare a proteinei A.

Deşi, chiar şi în prezent, procedeul este încă folosit în modul descris, se apreciază că el nu este suficient ; într-adevăr, în condiţii bine stabilite, proteina A poate scoate din ser cea mai mare parte din componenta IgG, dar nu are efect asupra subclasei IgG3 şi nici asupra imunoglobulinelor A, astfel încît activitatea specifică rămasă după adsorbţie se poate datora acestor componente. Pe de altă parte, proteina A reţine şi o proporţie ridicată care poate ajunge pînă la 45% din imunoglobulinele M, încît la niveluri scăzute de anticorpi de tip IgM tratarea îi elimină şi nu mai pot fi detectaţi.

Pentru a dovedi că activitatea specifică rămasă după adsorbţia cu proteină A ţine de anticorpii IgM, s-au preconizat prelucrări suplimentare : o nouă adsorbţie cu ser anti-IgG, cu ser anti-IgA şi, pentru control, ser anti-IgM fixate pe diferite particule (latex, stafilococ Cowan I) ca şi o tratare cu 2-ME ; mai simplă şi rapidă, această ultimă modalitate are o largă utilizare (Fogel, 1985 ; Anichiforesei, 1986) (tabelul 15—XXIII).

TABELUL 15-XXIII

Determinare a anticorpilor de tip IgM în ser de la bolnav cu rubeolă
(după Fogel, 1982)

Control prin ultracentrifugare	Titruri HAI		
	Inițial	Adsorbție pe SPA	Adsorbție pe SPA urmată de tratare cu 2-ME
Ser. IgM +	256	64	8
Ser. IgM −	256	8	8

Dintre rezultatele consemnate în literatură menționăm :

— Morrel (1983) găsește că anticorpii față de antigenul HBs se află în IgG1 și IgG3, predominînd în ultima subclasă de imunoglobuline, iar Linde (1985) descrie precoce anticorpi IgG3 în rubeolă ; anticorpi IgA s-au identificat precoce în infecția urliană și în hepatita A. Meurman (1980) stabilește că în infecția urliană toate cazurile dovedesc anticorpi IgM prin IF și RIA, chiar dacă la mulți bolnavi RFC și nici chiar RIA nu evidențiază conversii semnificative pentru anticorpii IgG ; cu procedee foarte sensibile anticorpii IgM se evidențiază chiar din prima zi de boală. Similar, Bertrand (1982), în rubeolă, subliniază că, spre deosebire de serologia simplă (RFC), cînd doar 25% din bolnavi au titrul 1/32 la ziua a 7-a, cel puțin 50% demonstrează anticorpi IgM (prin procedee adecvate) în a 3-a zi de erupție. Fogel (1985) identifică serologic infecții rubeolice în timpul sarcinii, diferențiindu-le pe baza determinărilor de anticorpi IgM pe cele primare, care reprezintă adevăratul pericol de infectare congenitală sau de afectare a embrionului, în comparație cu reinfectările în care viremia se produce rareori. În parvovirozele umane *(sickle-cell anemia)*, Anderson (1982) dovedește, prin RIA-captură, anticorpi IgM la 17 din 20 de cazuri în care determinări curente nu au dovedit conversie.

Faulkner (1976) stabilește corelația anticorpi IgM/manifestări clinice în rubeola congenitală la 80% din cazuri. Cartner (1983) conchide că determinarea anitcorpilor IgM pentru CMV în sarcină permite înregistrarea celor cu risc de infecție intrauterină. Roggendorf (1983) arată că anticorpii IgM față de HB_c pot diagnostica 31% din cazuri cu AgHBs negativ în faza acută și persistă chiar 13—18 luni. Numeroase exemple atestă persistența îndelungată a anticorpilor IgM în legătură cu menținerea și eliminarea prelungită a virusului din organism.

In concluzie, determinarea anticorpilor de tip IgM reprezintă un procedeu simplu și accesibil, mai ales în varianta tehnică a tratării cu proteina A și cu 2-ME, pentru stabilirea rapidă a diagnosticului unei infecții actuale sau recente, ca și a perspectivelor de evoluție a unor infecții virale ; o deosebită importanță se acordă acestei determinări în supravegherea gravidelor și recunoașterea infecțiilor congenitale.

15.3.11. ALTE PROCEDEE DE DIAGNOSTIC IMUNOLOGIC

În intenția de a găsi modalități accesibile și ușor de efectuat pentru a putea rezolva diagnosticul unei infecții virale, în decursul timpului s-au imaginat procedee — în mare majoritate cu caracter imunologic —, unele foarte ingenioase, simple, aplicabile la orice nivel (chiar laboratoare cu o dotare sub cea medie) ; de obicei, tocmai datorită simplității lor, aceste procedee asigură și un diagnostic mult mai rapid decît procedeele clasice, uneori chiar decît cele consacrate recent. Totuși, aceste procedee sînt grevate — tocmai datorită simplității lor — de subiectivitatea implicată în aprecierea rezultatelor și, bineînțeles, frecvent de o sensibilitate și specificitate mai redusă.

Socotim util ca unele din aceste procedee să fie cunoscute de către specialiști, tocmai pentru a marca efortul făcut în această direcție.

15.3.11.1. *Imunohemoliza radială (IHR)*

Imunohemoliza radială reprezintă o variantă a aplicării principiului imunohemolizei pasive (IHP), aceasta din urmă efectuîndu-se în eprubetă prin punerea în contact a diluțiilor din serul investigat cu hematii îmbrăcate cu antigen viral ; incubarea amestecului permite formarea complexului antigen — anticorp la suprafața hematiilor, datorită căruia se fixează și activează complementul adăugat într-o etapă ulterioară, ceea ce determină liza lor. Nivelul anticorpilor este indicat de ultima diluție de ser care mai produce o hemoliză caracteristică (totală sau 50%). IHP a fost mai puțin utilizată pentru diagnosticul infecțiilor virale : Skaug (1975) a folosit-o în rubeolă iar Strulovici (1977) — pentru infecția urliană ; în schimb varianta sa IHR a căpătat o largă utilizare datorită avantajelor pe care le are.

Realizarea IHR presupune înglobarea hematiilor sensibilizate într-un gel (agaroza este recomandată, gradul său de purificare eliminînd activitatea anticomplementară a agarului) solidificat pe lamă sau în cutii rotunde din sticlă sau — mai frecvent — din polistiren, de obicei cu diametrul de 6 cm ; în godeurile care se fac în acest gel se introduc serurile investigate, ca atare sau în diluții, preparatele incubîndu-se apoi la rece, în cameră umedă, un interval suficient pentru a se realiza difuzia radială a anticorpilor în masa gelului. În fine — dacă acesta nu a fost înglobat în prealabil în gel — suprafața gelului se acoperă cu o diluție convenabilă de complement și, după ce acesta a pătruns în masa sa, readucerea preparatului la 37°C face ca activarea produsă să determine liza hematiilor în jurul godeurilor, dimensiunea ariei de hemoliză fiind proporțională cu cantitatea de anticorpi prezenți în ser. Frecvent, în unele variante, complementul este înglobat în gel concomitent cu hematiile sensibilizate ; activarea și deci hemoliza se declanșează numai odată cu trecerea preparatului de la frigider la temperatura termostatului, după perioada de difuzie a anticorpilor (Alexandrescu și Lișcă, 1981).

Aprecierea rezultatului în IHR ține de dimensiunile ariilor de hemoliză produse în jurul godeurilor în care s-a introdus serul și se poate referi la criterii diferite : suprafața ariei de hemoliză, diametrul sau raza (respectiv pătratul razei) acestei arii etc., de obicei prin raportare la o curbă-etalon întocmită din dimensiunile zonelor de hemoliză realizate de diluții ale unui ser cu activitate stabilită prin alte procedee. Astfel, IHR ne oferă avantajul unei determinări serologice pe o singură diluție de ser, dar, ca în oricare alt procedeu serologic, rezultatul se poate exprima și prin ultima diluție care mai produce o hemoliză semnificativă în jurul godeului.

În mod corespunzător, IHR poate să identifice sau să cuantifice antigene virale, scop pentru care se înglobează în gel hematii sensibilizate cu anticorpi. Detectarea antigenelor virale s-a realizat și cu ajutorul unei reacții de blocare a IHR, în care atît antigenul sensibilizant al hematiilor, cît și serul sînt cunoscute ca specificitate și potență ; serul imun, ca atare sau în diluții, este incubat în prealabil cu un volum egal din materialul presupus a conține antigen viral și abia apoi se introduce în godeuri. Prezența antigenului în materialul examinat se apreciază prin gradul reducerii diametrului zonei de hemoliză la diluția respectivă a serului, în comparație cu proba de control în care acesta nu a fost blocat ; o altă modalitate de apreciere constă în a titra serul prin IHR, atît după amestec cu materialul investigat, cît și fără a fi blocat, în funcție de diferența de titru realizată între cele două probe.

IHR comportă mai multe etape, parametrii fiecăreia influențînd în mod critic rezultatele :

— sensibilizarea hematiilor cu antigen viral și calitatea acestuia (purificare, potență) ;

— înglobarea hematiilor într-un gel adecvat (concentrația hematiilor și cea a gelului) ;

— folosirea complementului ;

— realizarea difuziei anticorpilor în gel (interval, temperatură).

Adesea, IHR se practică cu hematii care sînt sensibile la acțiunea unor virusuri hemaglutinante sau hemadsorbante, ceea ce permite o sensibilizare prin simpla adsorbție a antigenului diluat convenabil (de exemplu, antigen gripal sau urlian pe hematii de cocoș, antigen arboviral pe hematii de gîscă sau de pui de o zi) ; unele antigene virale se adsorb și pe hematii pe care le aglutinează slab sau nu le aglutinează deloc (de exemplu, antigen arboviral pe hematii de berbec). Pentru acestea, ca și pentru hematiile care nu pot fi sensibilizate în mod direct cu antigene virale, au fost preconizate prelucrări adecvate care să permită ca la suprafața lor să se adsoarbă orice fel de antigene hemaglutinante sau nehemaglutinante ; cel mai frecvent, în astfel de prelucrări se folosesc glutaraldehida, $CrCl_3$ sau KIO_4 — în concentrații care nu alterează capacitatea acestor hematii de a fi lizate în prezența complementului. În acest fel se pot folosi pentru IHR hematii aflate la îndemîna oricărui laborator, hematii de berbec sau cele de om OI, Rh(—), se asigură prelungirea duratei eficacității preparatelor ca și posibilitatea furnizării în teren a unor truse preparate centralizat.

Antigenul purificat reușește o sensibilizare superioară a hematiilor atît pentru nivelul specificității reacției, cît și pentru realizarea unei proporții ridicate de identificări serologice.

În privința agarozei, așa cum s-a amintit, aceasta trebuie să fie lipsită de activitate anticomplementară, proprie anumitor grupări chimice pe care le are geloza ; chiar pentru produsele recunoscute drept corespunzătoare se recomandă să se verifice fiecare lot. De obicei, se utilizează o concentrație în jur de 1%, dar fiecare lot se controlează, deoarece consistența gelului are o influență deosebită asupra ratei de difuzie a anticorpilor ca şi asupra aspectului hemolizei (de exemplu, la o concentraţie mai mare zona de hemoliză este mai clară). Grosimea gelului ca şi diametrul găurilor în care se introduce serul sînt factori critici, influenţînd volumul de ser şi cantitatea de anticorpi care difuzează.

Concentraţia de hematii sensibilizate trebuie aleasă corespunzător, căci atunci cînd este prea mare face ca aria de hemoliză să se reducă, iar cu cît sînt mai puţine hematii aceasta se evidenţiază mai greu.

Difuziei anticorpilor i se afectează în mod obişnuit 18—24 de ore, dar s-a constatat că după 6 ore dimensiunile ariei de hemoliză nu se mai modifică în chip semnificativ. Asupra cantităţii de ser care se introduce în godeuri indicaţiile diferă, dar mai important este ca pentru toate probele să se folosească acelaşi volum ca şi pentru cele ale serului-etalon care serveşte stabilirii curbei-etalon ; pentru simplificarea procedeului, ansa de tip Takatsy a fost astfel adaptată încît să elibereze constant direct pe gel un volum de 5 μL.

Complementul se foloseşte de obicei la o diluţie de 1/3—1/5 şi un volum de 1 mL pentru acoperirea stratului de gel dintr-o cutie de 6 cm diametru. În cazul unei concentraţii prea mici, scade claritatea zonei de hemoliză. Înglobarea complementului în gel poate duce, în condiţii nefavorabile de păstrare, la compromiterea preparatelor care nu se folosesc imediat (hemoliză spontană sau inactivarea complementului).

IHR s-a preconizat şi aplicat în numeroase sisteme virale (tabelul 15—XXIV), pentru unele din acestea fiind create truse speciale (de exemplu,

TABELUL 15-XXIV

Sisteme virale în care s-a utilizat IHR

Sistem viral	Indicaţii bibliografice	Observaţii
Virus gripal	Russel (1975) ; Schild (1975) ; Callow (1976) ; Farohi (1977) ; Duca (1978) ; Wesslen (1978) ; Aymard (1980)	
Virus rubeolic	Skaug (1975) ; Schild (1975) ; Grillner (1976) ; Strannegard (1976) ; Clarke (1977) ; Creţescu (1977) ; Appleton (1978) ; Forger (1979) ; Fogel (1982) ; Field (1984) (în infecţii postnatale)	hematii diferite (pui de găină de o zi, porumbel, berbec)
Virus rujeolic	Wesslen (1978) ; Rapicetta (1983)	
Virus herpetic	Klingeborn (1978)	
Adenovirusuri	Hierholzer (1977)	
Coronavirusuri	Hierholzer (1977) ; Riiski (1977)	
Reovirus	Gee (1978)	
Virus urlian	Grillner (1976) ; Väänänen (1978) ; Harweg (1979)	
Arbovirusuri	Odelola (1978) ; Duca (1979) ; Ungureanu (1979) ; Gaidamovici (1979, 1980)	hematii diferite (cocoş, gîscă, hamster, berbec)

pentru rubeolă). Rezultatele sale se corelează cu cele ale detectării globale a anticorpilor și mai ales a celor de tip IgG prin alte procedee serologice (HAI, RFC, chiar și cu ELISA) ; specificitatea IHR pare a se asemăna cu cea RFC și chiar cu cea din reacția de neutralizare (de exemplu, în infecțiile arbovirale nu evidențiază acele înrudiri antigenice ale unor flavivirusuri ca atunci cînd se efectuează HAI).

IHR prezintă numeroase avantaje față de alte procedee de diagnostic serologic în infecțiile virale (HAI în special, RFC, RN). În comparație cu HAI, imunohemoliza radială are avantajul că se poate folosi și în cazul unor virusuri nehemaglutinante (de exemplu, unele arbovirusuri, coronavirusuri etc.), nu necesită prelucrările speciale impuse de îndepărtarea inhibitorilor nespecifici și nici nu depinde de unele condiții de pH sau temperatură, socotite indispensabile (de exemplu, IHR cu diferite arbovirusuri poate folosi hematii de berbec, la pH neutru și la temperatura termostatului după incubarea la rece) ; serul necesită doar inactivare termică și, eventual — dacă nu se folosesc hematii de om OI, Rh(—)—, se adsorb cu hematii normale de tipul celor sensibilizate și introduse în gel.

În comparație cu RFC apare faptul că IHR nu necesită prelucrări prealabile pentru pregătirea sistemului hemolitic sau pentru stabilirea dozelor de complement. Cu grad apropiat de specificitate, IHR este mai accesibilă și se rezolvă simplu și rapid în comparație cu reacția de neutralizare, chiar atunci cînd aceasta se efectuează pe culturi de celule.

Cu ocazia investigării anticorpilor în infecția rubeolică (Clarke, 1977) s-a ajuns la concluzia că în IHR nu pot fi determinați cei de tip IgM, fapt explicat prin proporția redusă a anticorpilor printre imunoglobulinele M serice, acestea la rîndul lor reprezentînd numai o mică parte din totalul de imunoglobuline serice ; ar interveni și difuzarea mai lentă, datorită dimensiunilor pe care le are această macromoleculă. Totuși, experimente de fracționare a serurilor și folosire a fracțiunilor IgM concentrate arată că și acești anticorpi realizează imunohemoliză și pot difuza în gel.

IHR s-a dovedit în stare să detecteze antigenul arboviral prin procedeul de blocare amintit, înainte de apariția îmbolnăvirilor animalelor inoculate intracerebral cu doze diferite de virus, sugerînd totodată și acumularea în creier a unei cantități de material viral proporțional cu masivitatea infectării (Ungureanu, 1982).

Chiar dacă nu există (încă) posibilitatea de standardizare riguroasă prin care să se asigure o exprimare comparabilă a rezultatelor din diferite laboratoare, prin marea sa accesibilitate și simplitate, folosind o singură diluție de ser, IHR apare ca un procedeu avantajos pentru anchete seroepidemiologice și atunci cînd trebuie să se dovedească seroconversii semnificative în infecții sau în campanii de vaccinare.

15.3.11.2. *Testul de hemaglutinare prin imunoaderență (IAHA)*

Cunoscut ca IAHA *(Immune Adherence Hemagglutination Test)*, încă din 1966 (Ito și Tagaya), acest test a fost rareori aplicat în diagnosticul infecțiilor virale (tabelul 15—XXV).

TABELUL 15-XXV

Unele utilizări ale IAHA pentru diagnosticul infecțiilor virale

Sistem viral	Indicații bibliografice
HAV	Krugman (1975) ; Miller (1975) ; Moritsugu (1976)
HBV	Maymi (1971) ; Tsuda (1975)
HSV	Levine (1978) ; Gillani (1978)
VZV	Gershon (1976) ; Gillani (1978) ; Forghani (1978)
V. gripal	Lennette (1978)

Procedeul se bazează pe faptul că, odată cu formarea complexului imun antigen — anticorp, complementul este activat și, prin intermediul receptorilor C3b, acesta este legat de hematii de om grup 0 ca și de cele provenind de la alte primate (Nelson, 1963 ; Lennette, 1978) ; la temperatura camerei, în 1—2 ore, se produce o hemaglutinare caracteristică.

S-a apreciat că procedeul este valoros în comparație, de exemplu, cu RFC, atît prin rapiditate, cît și prin sensibilitatea superioară (Champsaur, 1983 ; Kobayashi, 1984).

15.3.11.3. *Determinarea imunologică în strat subțire (TIA)*

Încă din 1976, Elwing, Nilsson și Ouchterlony au indicat principii de vizualizare a proceselor imunologice în strat subțire *(Thin Layer Immunoassay* — TIA), pe suprafețe de material plastic, ca procedeu simplu și sensibil, accesibil oricărui laborator cu dotare foarte slabă (fig. 15—20).

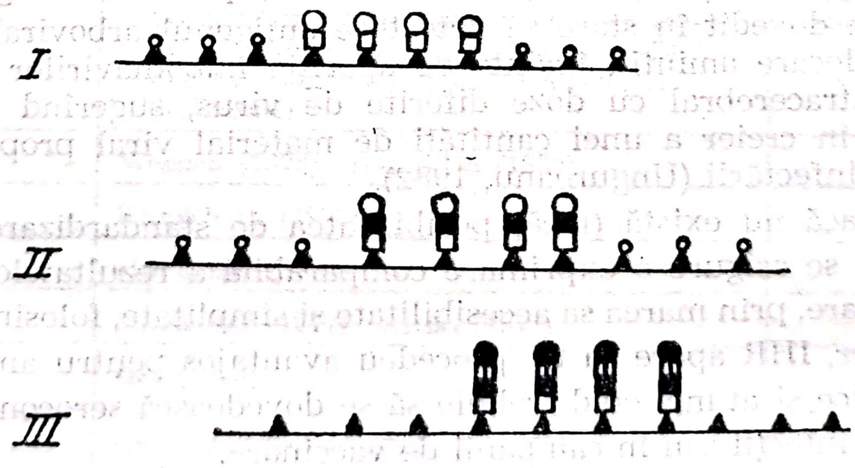


Fig. 15-20 — Schema variantelor TIA *(I, II, III)* (după Z. Elwing și colab., Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 1977, 51, 757).

▲▲▲ — suprafață îmbrăcată cu antigen ; □□□ — anticorpi specifici ; ■■■ — antiimunoglobulina anticorpului specific ; |⊥| |⊥| |⊥| — anticorpi antihematici ; ●●● — hematii ; ∘ ∘ ○ ○ — picături de condensare.

De fapt, este vorba de o îmbrăcare cu antigen a unei suprafețe de material plastic (polistiren) și blocarea situsurilor rămase libere cu o proteină inertă în sistemul imunologic dat ; de obicei, se folosesc cutii rotunde de polistiren care, astfel pregătite, pot fi păstrate mai multă vreme.

La utilizare se toarnă în cutie agar sau agaroză topită și, după solidificarea acesteia într-un strat gros de aproximativ 2,5 mm, se practică găuri după o schemă convenabilă. În aceste găuri se introduce serul investigat, în diluții sau ca atare, lăsîndu-se să difuzeze și să se producă reacția antigen — anticorp cu materialul cu care suprafața cutiei a fost îmbrăcată ; după 24—48 de ore, gelul se îndepărtează și apoi se apreciază rezultatul, operațiune pentru care s-au descris mai multe posibilități :

1. Suprafața pe care s-a desfășurat reacția imunologică se expune deasupra unui vas cu apă încălzită la 60°C ; în ariile în care s-au produs complexe antigen — anticorp se înregistrează un sistem deosebit de condensare cu particule de apă mari și confluente, net deosebite de „modificarea“ din jur. Diametrul ariilor de condensare apare proporțional cu concentrația anticorpilor în ser.

2. După îndepărtarea gelului se folosește un al doilea anticorp și apoi se face expunerea la vapori și se examinează aspectul condensării lor (variantă descrisă ca o vizualizare întărită imunologic).

3. În fine, după folosirea antiglobulinei ca în varianta precedentă, se adaugă un sistem de hematii sensibilizate în doze subaglutinante în măsură să reacționeze cu aceeași antiglobulină ; reacția se vizualizează printr-o hemadsorbție „mixtă“, hematiile sensibilizate atașîndu-se suprafețelor pe care s-a desfășurat reacția primară antigen — anticorp. Reacția astfel preconizată a dovedit capacitatea unei cuantificări a anticorpilor foarte importantă : TIA simplă — 3,1 μg/mL anticorpi, cea întărită imunologic — 0,39 μg/mL iar ultima variantă — chiar 0,024 μg/mL.

Totuși procedeul nu pare a se preta pentru o standardizare corespunzătoare, grevat fiind de multă subiectivitate în aprecierea rezultatelor (deși există posibilitatea obținerii unor imagini foto), astfel încît nu are o aplicare decît de experimentare în unele sisteme virale.

15.3.11.4. *Determinări în fază solidă derivate din RIE*

În principiu, aceste procedee fac parte mai ales din cele menite să evidențieze anticorpii IgM prin captură : faza solidă prin anticorpii fixați (anti-μ) reține IgM din ser și anticorpii din aceasta reacționează specific cu antigenul viral ; în RIE, așa cum am menționat, această recunoaștere se face prin marcarea antigenului cu enzimă sau prin recunoașterea unui antigen nemarcat, cu ajutorul conjugatelor imunoglobulinice specifice, în tehnici directe sau indirecte.

Pentru laboratoarele mici, RIE fiind mai pretențioase pot fi evitate : dacă antigenul are proprietăți hemaglutinante, în godeurile în care s-au desfășurat toate etapele pînă la reținerea antigenului hemaglutinant se adaugă hematii sensibile la activitatea acestuia, ceea ce va fi urmată de depunerea lor „în umbrelă“, caracteristică adsorbției la hemaglutinina prezentă, în timp ce, în absența anticorpilor IgM și deci a antigenului (care nu a mai avut de cine să fie reținut), hematiile se depun „în buton“.

Restrîngînd etapele și lărgind aria de aplicare a procedeului, imediat după tratarea fazei solide cu serul din care se rețin anticorpii antivirali de tip IgM, în locul antigenului brut urmat de suspensie de hematii se adaugă suspensie de latex sensibilizat cu antigen viral ; imaginea depunerii latexului în reacțiile pozitive este de asemenea caractestistică, „în umbrelă“, față de o depunere „în buton“ sau menținerea unei suspensii omogene.

15.3.12. HIBRIDIZAREA

Metodologia hibridizării acizilor nucleici virali a trecut din domeniul cercetării în cel al diagnosticului infecțiilor virale, datorită posibilităților pe care le are de a detecta informația genetică proprie virusului în cauză, chiar în absența produselor genei sau a activităților metabolice măsurabile ; cu atît mai mult, avantajul acestei metode apare în cazul virusurilor care sînt infectate fără a exprima proteine virale în organismul afectat și mai ales atunci cînd se află încorporat în genomul celulei-gazdă. (Feinman, 1984 ; Anderson, 1985 ; Haase, 1985 ; Scott, 1988 ; Chien-Feng Sun, 1988).

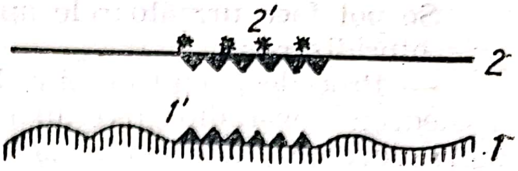
La baza acestei metodologii se află principiul fundamental al determinării informației genetice prin secvența celor patru baze componente ale acizilor nucleici. Această secvență este unică pentru fiecare organism și pentru fiecare genă din organism și poate fi identificată cu specificitate absolută prin hibridizare cu un eșantion de acid nucleic complementar.

În mod practic, în efectuarea procedeului se realizează o disociere a celor două lanțuri ADN la temperatură ridicată, pentru ca ulterior — în anumite condiții precise de temperatură și prezență ionică —, duplexurile stabile să se refacă folosind un eșantion complementar marcat ; lanțurile mono- se separă de cele duble, iar acestea din urmă sînt recunoscute datorită markerului folosit pentru eșantionul complementar : de obicei, eșantionul este marcat radioactiv (^{125}I, ^{32}P, ^{35}S) sau printr-o grupare chimică introdusă în eșantion, grupare care se identifică după hibridizare cu ajutorul unei molecule de recunoaștere (cel mai frecvent, biotina în combinație cu avidina sau streptavidina sau diferite haptene care se detectează cu anticorpii corespunzători) ; detectarea se face frecvent și cu ajutorul unei enzime fixate pe detector, prin reacții de culoare sau chemiluminiscență, precum și cu enzime fixate direct pe eșantionul de hibridizare (peroxidază, fosfatază alcalină), recunoașterea obținîndu-se într-o singură etapă. Procedeele non-radioactive prezintă o serie de avantaje : eșantioanele sînt stabile, pot fi folosite în concentrații mai mari pentru a crește rata de hibridizare, detectează chiar markeri de afinitate pentru anumite secvențe.

Hibridizarea se efectuează fie *in situ*, fie *in vitro* ; *in situ* hibridizarea folosește direct celule și țesuturi fixate pe un suport, prelucrarea adecvată a lor asigură păstrarea structurilor celulare, iar examinarea se face microscopic combinat cu autoradiografierea, obținîndu-se astfel localizarea secvențelor nucleotidice investigate.

In vitro există procedee de hibridizare, numite „în fază neomogenă“ *(mixed phase)*, și unele în soluție. Dintre primele, în varianta directă, acidul nucleic-țintă (ANț), monocatenar, extras din proba ce se examinează,

Fig. 15-21 — Hibridizare directă.
1 — segment monocatenar cu specificație *(1′)*, fixat pe filtru (suport) ; *2* — segment complementar — eșantion marcat *(2′)*.



este trecut pe un suport inert (de obicei, membrană de nitroceluloză), fixat spre a se împiedica refacerea lanțurilor duble, și se tratează apoi cu eșantionul de AN marcat ; după înlăturarea excesului, hibrizii formați pe filtru sînt măsurați (fig. 15—21). ANț depus în picătură pe filtru („*spot*“ sau „*dot-blot*“-hibridizare) permite o demonstrare semicantitativă : dacă fragmentele de ADN se separă de cele ARN înainte de transferarea pe filtru, se pot obține informații despre mărimea fragmentelor de AN specific („Southern“—, sau „Northern blot“-hibridizare pentru ADN și respectiv ARN). În cadrul aceluiași tip de procedee se include și procedeul „sandwich“-hibridizare care asigură o simplificare pentru situația în care trebuie să se folosească eșantioane marcate multiple ; fiecare specificitate investigată necesită două eșantioane, din care unul — fără marker — se fixează pe filtru, iar celălalt se află în soluția la care se adaugă și ANț. Eșantionul complementar de pe filtru are rol de captură a complexului ANț — eșantion marcat, „sandwich“-hibridizarea fiind de fapt un procedeu indirect (fig. 15—22). Printre alte utilizări, ea s-a efectuat și pentru identificarea prezenței materialului adenoviral în secreții nazofaringiene și a CMV în urină.

Hibridizarea *in situ* reprezintă de fapt tot un procedeu în fază neomogenă.

Așa cum indică și numele, hibridizarea în soluție aduce toate componentele necesare în soluție, cu avantajul realizării unei rate mari a procesului. Separarea hibridizilor formați se bazează fie pe afinitate (proba prin captură fiind modificată printr-un ligand pentru suport, precum biotina cu streptavidina pe bile de agaroză sau haptene cu anticorpii corespunzători în plăci cu godeuri), fie pe legarea specifică a AN dublucatenari de către hidroxilapatită. Hibridizarea în soluție se efectuează rapid — de la 15 minute la 2 ore—, rezultatul se obține într-o singură zi, iar examenul se poate face pe un produs brut.

Ca procedeu de diagnostic, hibridizarea s-a utilizat în diferite infecții virale : adenovirusuri (1983, 1985), CMV (1984), SV40 (1972, 1974), HBV (1980, 1980, 1982, 1982, 1986), enterovirus (1984, 1985), parvovirus canin (1984).

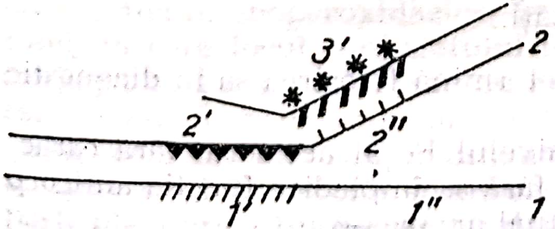


Fig. 15-22 — Hibridizare indirectă.
1 — segment complementar cu specificație de captură *(1′)*, fixat pe filtru (suport) *(1″)* ; *2* — segment monocatenar cu specificație complementară pentru *1′ (2′)* și cu specificație *(2″)* pentru eșantionul marcat ; *3* — segment complementar — eșantion marcat, cu specificație (3′) pentru 2″.

Se pot face următoarele aprecieri asupra metodologiei de diagnostic prin hibridizare :

— Procedeele cu izotopi radioactivi pot detecta 10^4 molecule din ANţ ; procedeele non-radioactive apar de 10 ori mai puţin sensibile, putînd detecta secvenţe-ţintă pînă la 0,3—15 pg.

— În diagnostic se foloseşte încă metodologia aplicată în cercetare, dar pentru activitatea de rutină apar indicate ameliorări care să permită un rezultat rapid (o zi), procedee cu o sensibilitate mărită şi cu manipulări puţine, folosindu-se produse stabile, neradioactive, accesibile laboratoarelor de diagnostic.

Kurstak şi colab. (1986), apreciind performanţele hibridizării (de exemplu, identificarea şi discriminarea tipurilor de CMV în urină la cei imunosupresaţi etc.) subliniază avantajele folosirii eşantioanelor-indicator marcate cu enzime în locul izotopilor radioactivi (preparate stabile, mai ieftine, accesibile, fără pericole) la un grad asemănător de sensibilitate.

Investigaţia serologică prin RIE şi cea genomică (eşantioane-indicator sau „probe“ marcate cu enzime) sînt complementare, ultima fiind deosebit de utilă în detectarea virusului sau a complexelor sale imune pentru care RIE sînt mai puţin sensibile, în timp ce acestea sînt necesare pentru detectarea anticorpilor.

Eşantioanele-indicator („probe“) pot fi legate cu biotină, localizarea făcîndu-se apoi cu enzime legate de avidină sau streptavidină — ultima recomandată în mod special pentru procedeele *in situ*, întrucît avidina mai poate reacţiona nespecific cu acizii nucleici. Prin introducerea *polymerase chain reaction*, hibridizarea îşi amplifică sensibilitatea (Salimant M.M.M., 1989).

15.4. PROTEINA A (PA) ŞI STAFILOCOCUL COWAN I (SPA) CARE O CONŢINE ÎN DIAGNOSTICUL INFECŢIILOR VIRALE

În ultimii ani proteina A şi stafilococul Cowan I care o conţine au căpătat numeroase şi diferite utilizări în diagnosticul microbiologic, dintre care unele sînt adresate şi infecţiilor virale.

La baza acestei uitlizări se află proprietatea PA de a lega imunoglobulinele prin receptorii pe care îi posedă (4 situsuri de legare pentru fiecare moleculă) ; molecula ei fiind relativ mică (aproximativ 42 000 daltoni), există deci capacitatea de a pătrunde în celule, ca şi posibilitatea de a fi marcată prin conjugare cu izotopi radioactivi, enzime sau fluorocromi. De obicei, legată de peretele bacterian, PA poate fi eliberată în mediul de cultură sau extrasă din stafilococ prin diferite procedee, încît întrebuinţările ei capătă o gamă largă de posibilităţi.

Dintre proprietăţile PA, cele care determină folosirea sa în diagnostic sînt :

— PA leagă imunoglobulinele la nivelul Fc al acestora, fără caracterul unei reacţii antigen — anticorp şi fără să împiedice funcţia anticorp pe care imunoglobulina respectivă eventual ar avea-o.

— Cel puțin pentru IgM molecula de PA are și receptori pentru Fab.

— Dintre imunoglobuline, cu precădere sînt legate cele IgG, cu diferențieri în cadrul subclaselor : IgG3 nu este legată de către PA. În funcție de raportul PA/IgG în complexul format, acesta poate funcționa ca un anticorp IgM sau ca unul IgG, cu consecințe corespunzătoare (de exemplu, împiedicarea legării complementului la un complex antigen — anticorp dacă la acesta se află conexată și PA). Dacă inițial s-a considerat că PA nu leagă IgM, astăzi se știe că această legare este posibilă, afectînd chiar pînă la 45% din conținutul în IgM, în condițiile în care IgG este legată în proporție de 95% ; se pare că există capacitatea de a lega și IgA, însă într-o proporție foarte redusă. Capacitatea de legare a PA, la fel cu gradul de reținere a imunoglobulinei în complex, apare legată și de pH.

— În fine, importantă apare capacitatea PA de a lega diferențiat imunoglobulinele provenind de la specii diferite : astfel, IgG provenind de la om, iepure, cobai, cîine sînt puternic legate cu PA, în timp ce acele care provin de la oaie, capră, șobolan, pasăre se leagă foarte puțin sau nu se leagă deloc.

Consecințele practice ale proprietăților menționate sînt prezentate în continuare :

— Unele rezultate negative în investigații care folosesc PA/SPA pot ține de preponderența anticorpilor de tip IgM, IgA sau IgG3, care nu reacționează deloc sau reacționează într-o măsură foarte slabă cu reactivul stafilococic.

— Reactivul stafilococic nu reacționează cu seruri ce provin de la anumite specii, dintre care unele sînt curent folosite în laboratorul de virusologie (de exemplu, serul de capră și mai ales cel de cocoș) și astfel nu sînt indicate pentru adsorbții diferențiale și mai ales pentru sensibilizarea stafilococului necesar în procedee de coaglutinare sau pentru probe indirecte de identificare a antigenelor virale prin IF, RIA sau RIE.

— Important este, de asemenea, ca ciclul de imunizare pentru obținerea de seruri ce vor fi folosite în procedee la care participă și PA/SPA să fie astfel realizat încît acestea să ajungă să aibă predominant anticorpi de tip IgG.

Aplicații ale PA/SPA în diagnosticul infecțiilor virale se adresează unor diferite aspecte :

1. Localizarea antigenelor virale la nivelul celulelor infectate, indiferent dacă acestea provin direct de la bolnav în probele de secreții, excreții, țesuturi și organe sau dacă provin din sisteme biologice care au fost inoculate cu probele menționate, cel mai des fiind vorba de culturi de celule.

Procedeele tehnice sînt similare cu cele ale imunofluorescenței sau ale reacției imunoperoxidazice, de tip indirect sau de fixare a complementului, în care locul conjugatului antiglobulinic este luat de obicei de un conjugat de PA cu ITCF sau cu PO. În cazul folosirii chiar a SPA, acesta este colorat fie prin conjugare cu ITCF, fie direct cu acridinoranj, iar imaginea realizată microscopic este aceea a unei rozetări : celula care conține antigen viral la nivelul membranei este înconjurată de un „colier“ de particule sferice fluorescente ; dar procedeul se poate executa și cu SPA necolorat (Ghyka, 1979 ; Simon, 1977) (fig. 15—23).

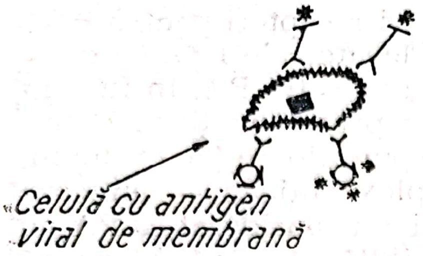


Fig. 15-23 — Identificarea antigenelor virale la nivelul membranei celulare printr-o reacție indirectă cu PA/SPA marcată cu ITCF/PO sau SPA necolorat.
▬ — PA ; ▬* — PA marcată cu ITCF/PO ; Y — imunoglobulină-anticorp. O — particulă stafilococică ; * — fluorocrom sau enzimă — Markes.

Folosirea PA/SPA—ITCF exclude reacții fals pozitive ce țin de receptori pentru IgG, care apar de obicei la suprafața celulelor infectate cu virus herpetic, citomegalic etc. (Simon, 1977).

Conjugatele de PA sau SPA cu ITCF ori PO se pot folosi ca și conjugatele antiglobulinice în reacțiile de tip indirect pentru determinarea anticorpilor în serul bolnavilor, preparatele antigenice fiind reprezentate — așa cum se știe — de celule infectate, etalate pe lame și colorate corespunzător.

În aceste condiții, fluorescența de fond, obișnuită în examenul IF cu conjugate antiglobulinice, este evitată.

Important însă este faptul ca, în cazul identificării antigenelor virale în celulele de la bolnav, serul imun să fie preparat pe o specie ale cărei imunoglobuline se leagă cu PA și să conțină preponderent anticorpi de tip IgG ; de asemenea, trebuie să se aibă în vedere că în identificarea anticorpilor folosind conjugate de PA/SPA, acestea nu se leagă de unele componente imunoglobulinice și rezultatul poate apărea ca foarte slab sau chiar negativ.

Există varianta tehnică prin care celulele dintr-un anumit produs pot fi reținute pe un filtru adecvat, apoi colorate indirect cu conjugat PA/SPA—ITCF și examinate microscopic (de exemplu, virusul herpetic) (Morgensen, 1983).

2. Procedeele în fază solidă beneficiază și ele de folosirea conjugatelor PA cu izotopi, enzime sau fluorocromi în reacții de tip RIA, RIE sau FIA, atît pentru decelarea antigenelor virale, cît mai ales pentru cea a anticorpilor, prin înlocuirea conjugatelor antiglobulinice ; avantajul constă și în reducerea fondului nespecific, ca și în evitarea eventualei desprinderi a primului anticorp.

În aceste reacții, pe lîngă faza solidă reprezentată ca de obicei de eprubete, bile sau lame de diverși polimeri îmbrăcate cu antigeni virali, se pot folosi chiar celule infectate cu virus, fie reținute pe filtre de sticlă (de exemplu, Richman și colab., în 1981, realizează detectare de anticorpi față de virusul varicelei cu conjugat PA—^{125}I), fie fixate pe pereții eprubetei sau în godeu (fig. 15—24).

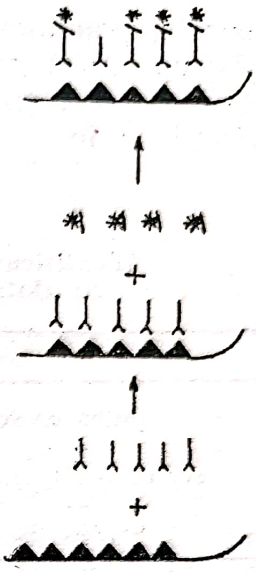
Conjugatele PA cu izotopi, enzime sau fluorocromi au o serie de avantaje :

— Obținerea de cantități mari, cu ușurință, în comparație cu prepararea serurilor antiglobulinice.

— Preparatele sînt standardizate și foarte stabile.

— Interacțiunea preparatelor de PA/SPA cu primul anticorp este mult mai rapidă decît aceea imunologică în cazul folosirii conjugatelor antiglobulinice.

Fig. 15-24 — Reacţii RIA, RIE, FIA efectuate cu PA marcată.
▲ — antigen viral fixat pe fază solidă ; ⅄ — anticorp ;
*| — PA marcată cu izotopi, enzime sau ITCF.



— Preparatele sînt lipsite de interacţiuni nespecifice cu substratul celular sau faza solidă şi astfel specificitatea reacţiilor este mult mărită, măsurătorile de fond sînt mult mai reduse : de exemplu, legarea PA—^{125}I la pereţii eprubetelor de polistiren este de numai 250 c.p.m. faţă de 10 000 c.p.m. în cazul antiglobulinelor marcate (Langone, 1976) ; de asemenea, aceasta ţine şi de posibilitatea folosirii conjugatului de PA la o diluţie mult mai mare decît aceea a conjugatului antiglobulinic.

— În fine, un singur conjugat PA poate folosi în reacţii la care primul anticorp provine de la specii diferite ; nu trebuie totuşi uitate limitele menţionate legate de reactivitatea PA numai cu imunoglobulinele de la anumite specii.

3. Datorită afinităţii selective pentru anumite imunoglobuline, PA şi SPA pot servi la separarea lor (ca atare sau deja complexate cu antigen) de restul componentelor serice sau reactanţi care participă la anumite procedee de diagnostic.

— În primul rînd PA şi SPA oferă posibilitatea purificării de antigene sau anticorpi virali : antigenul poate fi reţinut pe şi apoi eluat de pe Sepharoză — PA — anticorpi sau pe suspensie de SPA — anticorpi ; anticorpii conjugaţi cu enzime se purifică prin trecere şi apoi eluare de pe coloană de Sephadex Cl_4B—PA (Page şi colab., 1979).

— În al doilea rînd, capacitatea PA/SPA de a realiza separări de complexe imune a fost folosită în determinări de antigen sau anticorpi prin RIA ; în mod curent, procedeul se bazează pe precipitarea complexului anticorp — antigen marcat cu ^{125}I cu ajutorul unui al doilea anticorp adresat specificităţii primului intrat în reacţie şi prin măsurarea radioactivităţii rămase libere în supernatant.

Separarea prin al doilea anticorp este laborioasă (incubare peste noapte, centrifugare la 10 000 r.p.m.) iar reactivul imunologic se obţine greu. În schimb, suspensia de stafilococ reacţionează rapid cu anticorpul din complexul format şi îl antrenează în sediment în urma unei centrifugări de numai 15 minute la aproximativ 1 000 r.p.m. În acest fel, s-au efectuat separări pentru identificări de anticorpi virali (de exemplu, în varicelă, poliomielită sau hepatită), ca și identificarea antigenului HBs (Ulstrup, 1974) (tabelul 15—XXVI); de asemenea, procedeul servește la separarea și identificarea complexelor imune circulante în cursul unor infecții virale.

TABELUL 15-XXVI

Identificarea antigenului HBs sau a anticorpilor corespunzători cu ajutorul SPA în procedeul preconizat de Ulstrup (1974)

Eprubeta 1	Eprubeta 2
probă de ser + ser anti-HB$_s$ (incubare) + ^{125}IAgHBs	probă de ser + ^{125}IAgHBs
(incubare) + suspensie SPA (centrifugare)	
Rezultate :	
— AgHBs prezent în ser: în competiție cu ^{125}IAgHBs face ca acesta să fie inclus mai puțin în complexe antigen — anticorp și astfel radioactivitatea în sediment constituie numai o parte din cea introdusă în reacție — AgHBs absent în ser: toată radioactivitatea introdusă în tub apare în sediment	— AcHBs absenți: sediment fără radioactivitate — AcHBs prezenți: complexele antigen-anticorp formate sînt antrenate de SPA și o parte din radioactivitate apar în sediment

— Capacitatea de a separa diferite componente serice a PA/SPA poate asigura îndepărtarea factorului reumatoid din serurile investigate pentru identificarea anticorpilor virali de tip IgM, acest factor realizînd frecvent reacții fals pozitive : IgG adsorbit pe suspensie de SPA se comportă ca un IgG agregat și, folosit astfel pentru tratarea serurilor, realizează fixarea și eliminarea factorului reumatoid. De altfel, noi am constatat că tratarea directă a serurilor cu suspensie de stafilococ Cowan I scoate concomitent cu IgG și factorul reumatoid.

— În fine, această capacitate de a separa componentele serice are cea mai largă aplicare ca procedeu de tratare a serurilor atunci cînd se urmărește stabilirea clasei de imunoglobuline cărora le aparțin anticorpii : în principiu, adsorbția elimină anticorpii de tip IgG din ser, activitatea restantă fiind pusă pe seama anticorpilor de tip IgM, a căror activitate se determină prin una din reacțiile serologice la îndemînă. Cu toate că adsorbția cu SPA trebuie completată cu alte prelucrări, dat fiind faptul că nu numai anticorpii de tip IgM pot fi implicați în activitatea restantă (de exemplu, rămîn neadsorbiți anticorpi de tip IgG3 și cei de tip IgA), procedeul are o largă răspîndire tocmai datorită simplității sale ca și marii accesibilități.

4. Coaglutinarea (COA) — ca procedeu de identificare a antigenelor printr-o aglutinare pe suport — nu a cunoscut o aplicare largă și generali-

zată în diagnosticul infecțiilor virale, așa cum a reușit pentru unele afecțiuni bacteriene. Încercările făcute au stabilit condițiile în care coaglutinarea poate fi eficientă pentru identificarea unor antigene virale : seruri imune puternice și un anumit nivel al concentrației de antigen viral.

În coaglutinare se folosește suspensia de stafilococ Cowan I sensibilizată cu anticorpii care se leagă prin fragmentul Fc de proteina A prezentă în peretele bacterian ; în prezența antigenului viral are loc reacția antigen — anticorp, în care este antrenat și stafilococul, și astfel o interacțiune care altfel nu este vizibilă devine accesibilă examenului cu ochiul liber ca o aglutinare de suspensie stafilococică.

Coaglutinarea se efectuează cel mai frecvent pe lamă, prin amestecarea unei picături de suspensie 1—2% stafilococ sensibilizat cu anticorpi și o picătură din materialul suspectat a conține virusul/antigenul viral ; rezultatul pozitiv se evidențiază într-un interval mai mare decît în cazul folosirii coaglutinării pentru diagnosticul bacteriologic (cel puțin 5 minute de agitare continuă) (fig. 15—25).

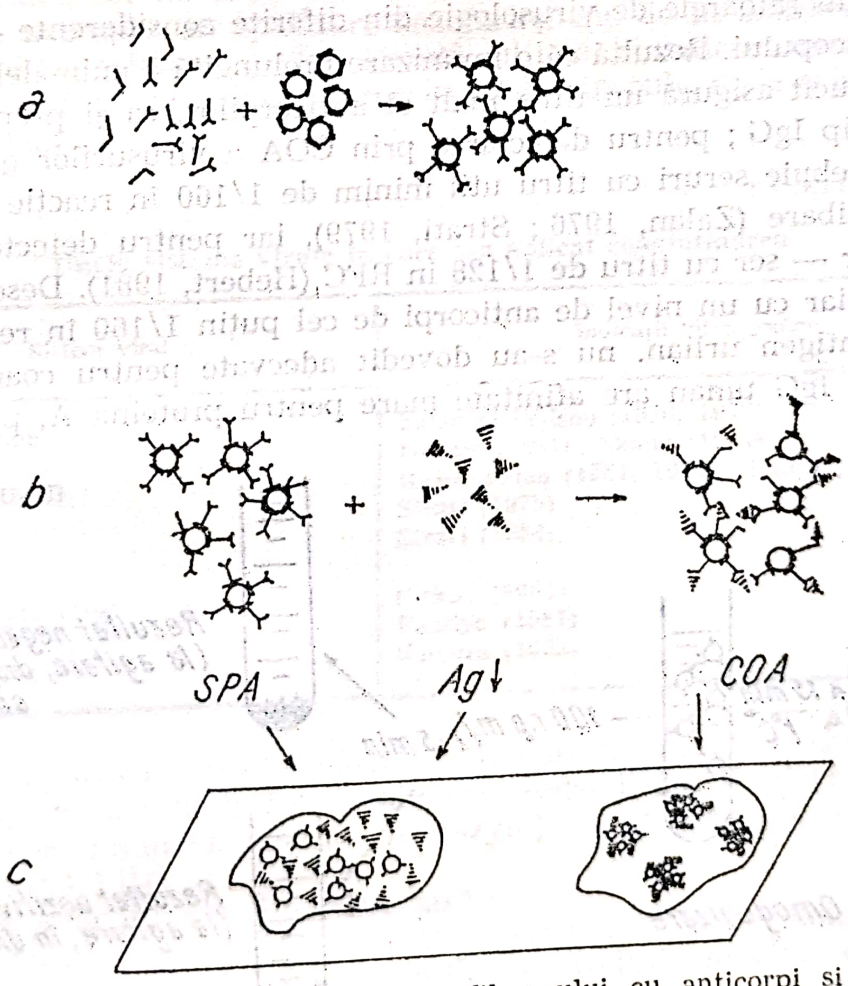


Fig. 15-25 — Sensibilizarea stafilococului cu anticorpi și identificarea antigenului viral prin coaglutinare pe lamă. a — sensibilizarea stafilococului Cowan I (SPA) ; b — coaglutinarea (schemă) ; c — aspectul coaglutinării pe lamă.

Reacția de coaglutinare se poate realiza și în eprubetă sau pe plăci cu godeuri ; performanțele sale au fost ameliorate atunci cînd în cursul executării în eprubetă, folosind un volum mai mare de material patologic, se efectuează și o scurtă centrifugare (100 r.p.m./2—5 minute) (fig. 15—26).

Sensibilitatea COA în detectarea antigenelor virale a fost apreciată la nivelul celei dovedite de procedee din generația a treia : de obicei 1—10 μg/mL și chiar 0,3—0,5 μg/mL pentru unele virusuri. În cazul virusurilor gripale și al celui urlian, COA a putut evidenția antigenele respective numai la o prezență ce corespunde la 8—64 UHA/0,2 mL, în funcție de materialul examinat (ouă embrionate sau culturi de celule) ; folosindu-se ameliorarea preconizată, sensibilitatea COA a fost de 2 UHA/mL.

Eficiența COA pentru identificarea antigenelor virale se află în strînsă dependență de serul cu care se sensibilizează suspensia de stafilococ Cowan I, fiind cunoscut că proteina A leagă cu precădere imunoglobulina G ; de asemenea, trebuie folosite seruri provenind de la specii animale ale căror imunoglobuline au afinitate pentru proteina A, precum cobai sau iepuri ; serurile preparate pe pasăre — frecvent prezente în laboratoarele de virusologie din diferite considerente — nu sînt adecvate scopului. Rezultă că o imunizare prelungită a animalelor este de dorit, întrucît asigură un titru înalt al anticorpilor, ca și preponderența celor de tip IgG ; pentru detectarea prin COA a virusurilor gripale sau urliene, trebuie seruri cu titru util minim de 1/160 în reacție de hemaglutinoinhibare (Zalan, 1976 ; Strati, 1979), iar pentru detectarea rotavirusurilor — ser cu titru de 1/128 în RFC (Hebert, 1981). Deseori seruri umane, chiar cu un nivel de anticorpi de cel puțin 1/160 în reacția HAI față de antigen urlian, nu s-au dovedit adecvate pentru coaglutinare ; chiar dacă IgG uman are afinitate mare pentru proteina A, probabil că

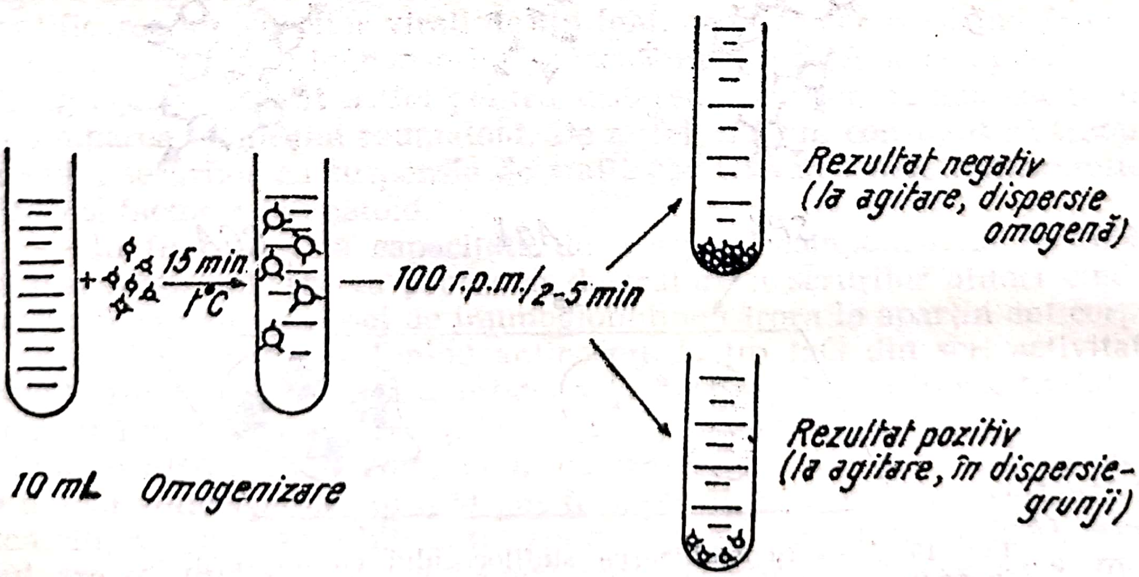

+
15 min
t°C
100 r.p.m./2-5 min
Rezultat negativ (la agitare, dispersie omogenă)
Rezultat pozitiv (la agitare, în dispersie-grunji)
10 mL
Omogenizare

Fig. 15-26 — Procedeul COA cu performanțe superioare.

o mare parte din anticorpii prezenţi în serurile respective aparţineau clasei IgM pe care stafilococul Cowan I le leagă într-o proporţie redusă (Strati, 1984).

În privinţa efectuării coaglutinării cu produse provenind direct de la bolnavi adesea se constată rezultatele nespecifice datorate conţinutului ridicat în proteine sau, eventual, prezenţei anticorpilor faţă de stafilococ (sînge, urină, LCR, spută), ceea ce impune prelucrări adecvate (tratare termică a probelor sau adsorbţia lor cu suspensie de stafilococ Cowan I).

Coaglutinarea se poate efectua şi cu produse provenind de la sisteme biologice inoculate cu materialul patologic ; în cazul virusului urlian s-a constatat că procedeul oferă rezultate pozitive chiar dacă lichidul de cultură celulară nu are activitate HAI. Coaglutinarea apare ca un procedeu deosebit de simplu pentru identificarea şi tipizarea rapidă a izolatelor virale, înlocuind alte procedee mai laborioase (RN sau RFC).

Aplicarea coaglutinării în diagnosticul unor infecţii virale la om (tabelul 15—XXVII), direct în probele provenind de la bolnavi, a permis decelarea antigenului atunci cînd acesta se găseşte în cantitate suficient de mare (de exemplu, antigen hepatitic B şi cel rotaviral în suspensii de materii fecale), dar nu şi în cele în care atingenul se află într-o cantitate redusă (de exemplu, în spălături nazofaringiene de la bolnavi de gripă sau parotidită epidemică). În această ultimă situaţie coaglutinarea se dovedeşte utilă pentru identificarea izolatelor în culturi de celule sau pe ouă embrionate.

TABELUL 15-XXVII

Unele sisteme virale în care s-a aplicat coaglutinarea

Sistem viral	Indicaţii bibliografice
Virusuri gripale	Zalan şi Wilson (1976, 1978)
Rotavirusuri	Hebert (1981) ; Skaug (1983)
Virus hepatitic B	Rajagopalan (1981, 1982) ; Babeş (1984)
Arbovirusuri	Strati (1979)
Virus urlian	Strati (1984)
Virusuri ale plantelor	Cirkov (1981)
Virusuri aviare	Pandya (1981)
Virusuri ale peştilor	Kimura (1983)

Dintre aplicările coaglutinării menţionăm posibilitatea de recunoaştere a antigenului rotaviral în fecale, cu o sensibilitate similară detectării prin procedee imunoenzimatice (Rotazym) şi microscopie electronică (tabelul 15—XXVIII).

5. Alte aplicaţii ale PA/SPA sînt :

— În microscopia electronică, PA marcată cu aur coloidal a fost folosită pentru recunoaşterea unor antigene virale la nivelul celulelor şi de asemenea la evidenţierea anticorpilor faţă de unele virusuri ; Louro (1984) a demonstrat o sensibilitate de 16—32 de ori mai mare decît aceea a IME obişnuită.

TABELUL 15-XXVIII

Sensibilitatea coaglutinării pentru decelarea antigenelor rotavirale în fecale, în comparație cu rezultatele examenului electronomicroscopic (ME)
(după Skaug, 1983)

		ME	
		+	−
Coaglutinare	+	34	0
Coaglutinare	−	2	41

— În microscopia electronică — ca și în reacții imunoenzimatice — identificarea antigenelor în diferite probe prin capturarea lor de către anticorpi este ameliorată dacă aceștia din urmă îmbracă suportul prin intermediul PA ; în ME varianta este cunoscută sub denumirea de SPIEM *(Solid Phase Immuno-Electron Microscopy)*, căreia Svensson (1982) îi atribuie o sensibilitate de trei ori mai mare decît aceea a IME obișnuite.

— În reacții în fază solidă, procedee de tip indirect pot folosi ca indicator SPA cuplat pe hematii, rezultatul avînd aspectul unei hemadsorbții.

15.5. ANTICORPII MONOCLONALI (AM)

Odată cu introducerea anticorpilor monoclonali, diagnosticul de laborator a căpătat un nou instrument de lucru, menit să amelioreze rezultatele investigațiilor (Galfre, 1981 ; Goldstein, 1983).

Față de serurile imune care, preparate pe animale, provin din nenumărate (eventual mii) tipuri de clone celulare față de un același epitop (de unde deosebirile dintre serurile obținute de la diferite animale și chiar de la același animal în recolte succesive), anticorpii monoclonali prezintă numeroase avantaje :

— provin de la o singură clonă celulară care poate fi menținută *in vitro* vreme îndelungată ;

— clona furnizează în această perioadă o cantitate mare de anticorpi cu aceeași specificitate față de un anumit epitop ;

— amestecul mai multor feluri de anticorpi monoclonali asigură o activitate înaltă și specificitate față de un antigen ;

— în reacțiile de diagnostic AM permit simplificări importante și creează noi variante tehnice, dat fiind posibilitatea folosirii a doi AM adresați aceluiași antigen viral dar la epitopi diferiți în procedee de tip sandwich ;

— procedeele cu AM pot fi mai ușor standardizate.

Pe de altă parte, AM oferă astăzi deosebite posibilități pentru identificarea, purificarea și stabilirea proprietăților antigenelor importante în activitatea de diagnostic.

În mod practic, în primul rînd este importantă selecția anticorpului monoclonal care trebuie să devină reactant diagnostic, atît ca specificitate, cît şi ca posibilitate de a fi folosit într-una sau alta din variantele tehnice ale procedeelor de diagnostic ; au fost făcute numeroase aprecieri asupra posibilităţilor şi condiţiilor în care AM se folosesc în diagnostic şi amintim printre acestea capacitatea de captură a antigenelor pe suporturi solide în procedee în fază solidă, ca şi acela de a se lega de un antigen fixat pe faza solidă.

În primul caz este vorba de îmbrăcarea suportului cu AM, situaţie care impune însă o perfectă individualizare a condiţiilor în care aceasta se realizează (de exemplu, unii pot îmbrăca suportul, alţii nu ; pentru fiecare AM este nevoie de un anumit pH etc.) ; ca variantă tehnică AM este fixat pe suport prin intermediul unei punţi reprezentate de un anticorp antişoarece, dat fiind această specificitate antigenică a AM rezultată din însuşi modul lor de preparare.

O a doua situaţie — legarea AM de antigenul viral prin epitopul căruia i se adresează — necesită de obicei un AM marcat ca pentru IF, RIA sau RIE, modalităţi folosite de altfel din ce în ce mai mult în practică (Woods, 1988) ; eventual această legare specifică poate fi inhibată, aşa cum se întîmplă în unele variante tehnice.

În mod schematic prepararea AM constă din imunizarea şoarecilor (diferite rase, de obicei femele) fie cu antigen viral convenţional, fie cu secvenţe polipeptidice sintetice care conţin numai cîte un epitop al antigenului viral (Modrow, 1987), ceea ce evident va uşura în mod deosebit selecţia clonelor celulare corespunzătoare.

La un anumit interval, celulele splenice provenind de la aceşti şoareci sînt fuzionate *in vitro* cu anumite celule ce au o capacitate deosebită de multiplicare (de exemplu, celule mielom Sp2/0), iar din hibridoamele obţinute se aleg cele care produc anticorpii căutaţi. În supernatantul culturilor unor astfel de hibridoame *in vitro* sau în ascita şoarecilor inoculaţi cu ele, se obţin anticorpii în cantităţi mari.

Capacitatea unor astfel de AM de a reacţiona cu antigenele virale diferă şi cu tipul investigaţiei ; astfel, Anderson (1984) constată că din cei patru AM realizaţi faţă de enterovirusul 70 — implicat în conjunctivitele acute hemoragice —, doar trei reacţionează cu toate tulpinile de enterovirus 70 în ELISA, doi AM reacţionează cu toate tulpinile prin IF şi, de asemenea, numai doi AM reuşesc neutralizarea virusului, specificitatea fiind 100% pentru toate.

Gleaves (1988) prin IF şi IPO (variantă tehnică PAP) cu anticorp 2H2.4 faţă de o proteină nucleară de 72 000 daltoni la virus herpetic indică înalta sensibilitate a procedeului.

Anticorpii monoclonali au fost aplicaţi în IF pentru antigen M gripal (Bucher, 1987), CMV în urină şi antigene CMV diferite în culturi de celule la 24 de ore după inoculare (Wirgart, 1987) etc., ca şi în TR-FIA pentru adenovirus 40 şi 41 şi pentru HBs.

Din ce în ce mai multe comunicări relatează despre folosirea AM în RIE, de exemplu, cu o sensibilitate în detectarea rotavirusurilor de 100% în comparaţie cu numai 56% în ME (Wang Chang An, 1987) ; Bucher (1987) notează o detecţie de 10 ng proteină M gripală. Tsai (1987) pentru flavivirusuri folosește AM specifici pentru captură și un conjugat de AM de grup pentru identificare, realizînd într-o singură zi detectarea a 50 pg proteină virală *per* 0,1 mL în țînțari sau culturi de celule. Richman (1987) aplică AM în variantele sale tehnice RIA și RIE prin filtrare.

Volumul activității cu AM crește în fiecare zi, mai ales că rezultatele sînt impresionante. Subtipările de virusuri ating limite deosebite : Guo Ren (1987) avînd la îndemînă 5 grupe de AM repartizează 85 de tulpini polio 1 în 10 subgrupe, iar cu alți 5 AM — 95 de tulpini polio 3 se grupează în 6 subgrupe.

Avantajele tehnice reies clar : de exemplu, în investigațiile pentru CMV, Fiacco (1984) arată că pentru scăderea fluorescenței nespecifice — prezentă în IF cu anticorpi policlonali — trebuie să se apeleze la o contracolorare (lăsînd la o parte faptul că se înregistrează și reacții fals pozitive cu virusuri varicelic și CMV simiene), în timp ce AM fluorescenți nu produc aceste neplăceri.

Efectiv uneori este mai ușor să se producă AM față de un virus (de exemplu, enterovirus 70), decît să se obțină un ser satisfăcător prin mijloace clasice pe animale.

Totuși, așa cum subliniază Grandien (1987) AM trebuie bine aleși și caracterizați înainte de a fi introduși în practică.

15.6. APRECIERI ASUPRA DIAGNOSTICULUI INFECȚIILOR VIRALE

În urmă cu multe decenii diagnosticul infecțiilor virale era limitat la virusurile mai simplu de izolat și de identificat sau la cele pentru care se puteau folosi procedee serologice obișnuite. În comparație cu elucidarea infecțiilor bacteriene, cele virale erau de multe ori numai presupuse, tocmai prin absența vreunui agent bacterian și etichetate ca „viroze digestive“ sau „viroze respiratorii“.

Odată cu perfecționarea culturilor de celule și stabilirea condițiilor proprii de cultivare a unor virusuri (de exemplu, temperaturi diferențiate, celule de anumite proveniențe, prelucrări prealabile ale produselor și culturilor inoculate etc.) au făcut ca „sacul fără fund“ al diagnosticelor generale de „infecții virale“ — reflectînd de fapt ignoranța noastră — să devină din ce în ce mai mic.

Progresele deosebite în imunologie și în genetică au lărgit cunoașterea intimă a virusurilor, a proceselor infecțioase pe care le determină și a consecințelor imunologice caracteristice.

Astăzi, fluorocromii, radioizotopii și enzimele fixate pe reactanții imunologici au dus la imaginarea unor procedee fără de care diagnosticul infecțiilor virale nu mai poate fi conceput.

Un loc important în dezvoltarea diagnosticului infecțiilor virale îl ocupă perfecționarea dispozitivelor și aparaturii care au ușurat activitatea laboratoarelor (automatizare, miniaturizare, spectro- și fluorometrie, microscoapele electronice cu putere de rezoluție din ce în ce mai mare etc.).

Așa se face că, în ultimele decenii, a devenit evident faptul că diagnosticul infecțiilor virale poate fi realizat într-un interval mult mai redus decît cel cu care ne obișnuiseră procedeele clasice (convenționale). Fără ca fenomenul să aibă un caracter general, diferențiat în funcție de sistemul viral în cauză, s-a introdus noțiunea de diagnostic „rapid“ în opoziție cu metodologia convențională.

Rînd pe rînd, diferite procedee au căpătat atributul de „rapide“, dar, în același timp, continuau să fie comparate cu diagnosticele convenționale care, totuși, apar necesare, tocmai spre a se putea stabili valoarea celor noi. Literatura anilor '70 și chiar cea actuală este plină de studii de acest fel.

Totuși, procedeele moderne de ordin imunologic — ameliorate în ultima vreme și prin posibilitățile anticorpilor monoclonali — sau cele bazate pe inginerie genetică trebuie să devină ele însele procedee „clasice“, „convenționale“ în activitatea de rutină a laboratoarelor. Așa-zisul diagnostic „rapid“ trebuie să dispară ca noțiune ; există un singur diagnostic al infecțiilor virale care trebuie să fie rezolvat în timp util.

Și, astfel, în schema diagnosticului curent în laboratoarele de virusologie trebuie să se găsească mijloacele materiale și umane prin care să se realizeze :

— identificarea în cîteva ore — imunologic sau nu — a componentelor virale în materialul recoltat de la bolnav ;

— izolarea și identificarea într-un interval cît mai scurt a virusurilor sau fragmentelor lor cu caracteristicile imunologice sau genetice proprii ;

— identificarea, încă din primele zile ale infecției virale, a modificărilor imunologice celulare sau umorale caracteristice.

⁂

Anexa I

Metodologia diagnosticului infecțiilor virale într-un laborator cu dotare medie

A. *Diagnostic virusologic*

1. Recoltarea materialelor de la bolnav.

2. Transportul materialelor la laborator.

3. Prelucrarea materialelor.

4. ● Eventuala investigare directă pentru recunoașterea unor antigene sau activități virale în materialele de la bolnav (de exemplu, hemaglutinare cu lichide de spălătură nazofaringiană ; dublă difuzie cu lichid de veziculă-pustulă) ; unele laboratoare pot beneficia de aportul IF și CIEF.

● Inoculare în SBS accesibile (animale, ouă embrionate, culturi de celule) și supravegherea evoluției infecției ; eventual pasaje oarbe.

Durată : zile — săptămîni

5. Identificarea izolatului (determinare de dimensiuni, comportare în prezența unor factori fizici sau chimici, activitate hemaglutinantă etc. și în special prin procedee imunologice: HAI, RFC, RN, DD, eventual IF și CIEF).

Durată : ore-zile-săptămîni.

B. *Diagnostic serologic*

1. Recoltarea unei probe de sînge în primele zile de boală:
Informativ, determinare de activități (HAI, FC, RN), eventual identificarea anticorpilor de tip IgM (procedee: SPA, 2-ME).
Stocarea serului.

2. Recoltarea probei a doua de sînge, la minimum 10—14 zile de la obținerea celei dintîi.
Determinarea de activități (HAI, FC, RN), eventual cu indentificarea anticorpilor de tip IgM (procedeu: SPA, 2-ME), concomitent cu reexaminarea primei probe de ser.
Stabilirea seroconversiei.

Durată: 2—3 săptămîni

Anexa II

Metodologia diagnosticului infecțiilor virale într-un laborator care are acces la procedee moderne

A. *Diagnostic virusologic*

1. Recoltarea materialelor de la bolnav.

2. Transportul materialelor la laborator.

3. Prelucrarea materialelor, eventual concentrare — purificare (ultracentrifugare, precipitare PEG etc.).

4. ● Investigare directă a materialului pentru evidențierea particulelor virale (ME, IME), a antigenelor virale la nivelul celulelor (IF, IPO), a antigenelor virale extracelular (RIA, RIE, FIA; HAPI, LA, COA; DD, CIEF), a acizilor nucleici (PAGE — impregnare argentică), a fragmentelor genomice (hibridizare).

● Inoculare în SBS accesibile (aninale, ouă embrionate, culturi de celule) și supravegherea evoluției infecției; eventual pasaje oarbe.

● La intervale adecvate (ore, zile), investigarea SBS pentru detectarea particulelor de virus replicat și a antigenelor virale intra- și extracelulare (inclusiv cele din sînge), precum și a genomului viral, indiferent dacă infecția se manifestă sau nu în vreun fel (ME, IME, IF, IPO, RIA, RIE, FIA; HAPI, LA, COA; DD, CIEF; hibriditare; HA-HAI, RFC)

Durată: ore, zile

5. Identificarea izolatului prin procedee clasice și moderne.

Durată: ore, zile

B. *Diagnostic serologic*

1. Recoltarea unei probe de sînge în primele zile de boală.
Determinarea anticorpilor prin procedee clasice (HAI, RFC, RN, DD) și moderne (IF, IPO; RIA, RIE; HAP; CIEF); precizarea clasei de imunoglobuline (anticorpi de tip IgM) prin procedee moderne (IF, IPO, RIA, RIE) sau clasice (HAI, RFC), în mod direct (IF, IPO, RIA, RIE) sau după separări de imunoglobuline prin ultracentrifugare, cromatografie, SPA, 2-ME (HAI, RFC, IF, IPO, RIA, RIE).
Durată: ore, zile

2. Recoltarea probei a doua de sînge, la 10—14 zile de la obținerea celei dintîi: determinarea anticorpilor concomitent în ambele probe (recunoașterea seroconversiei) și eventual identificarea anticorpilor de tip IgM (confirmarea infecției actuale); se utilizează procedee clasice și moderne în mod corespunzător.

Durată: 2—3 săptămîni

Anexa III

Procedee imunologice moderne în diagnosticul rapid al infecțiilor virale

Procedeu	Ce evidențiază și sensibilitatea				Durata de execuție
	particule virale	antigen viral	anticorpi		
			global	clase de imunoglobuline*	
ME IME	+++ ++++		posibil, dar neindicat pentru diagnostic de rutină		ore (max. 2) ore (max. 2)
IF, IPO		++	++	++	ore (max. 2)
RIA RIE FIA		++++ ++++ ++++	++++ ++++ ++++	++++ ++++ ++++	ore (4—24) ore (4—24) ore
HAP, HAPI LA COA		+++ +++ +	+++ +++		ore (4—6) minute minute-ore
CIEF		++	+		ore $\left(\frac{1}{2} - 2\right)$

* Numai cele care se folosesc de seruri anti-IgM sau anti-IgG în tehnici de tip indirect; toate procedeele se pot folosi după o prealabilă separare a diferitelor clase de imunoglobuline.

Bibliografie selectivă

ALEXANDRESCU M., LIȘCĂ M. — Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat., Iași, 1981,
ANDERSON M. J. și colab. — J. Med. Virol., 1985, 15, 163.
85, 527.
ANICHIFORESEI M. — Lucrare de diplomă, I.M.F. București, 1986.
ASKAA J., BLOCH B. — Acta vet. scand., 1981, 22, 32.
ATANASIU P. și colab. — Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol., 1982, 27, 301.
AYMARD M. și colab. — Pathol. Biol., 1980, 28, 335.
BÎLBÎIE V., POZSGY N. (red.) — Bacteriologie medicală, vol. I, Edit. Medicală, București, 1984.
BLACK S. B. și colab. — J. Lab. Clin. Med., 1983, 101, 450.
BLOMBERG J., KLASSE P. J. — J. Clin. Microbiol., 1988, 26, 106.
BLOMBERG J., KLASSE P. J. — J. Clin. Microbiol., 1988, 26, 111.
BRANDT C. D. și colab. — J. Clin. Microbiol., 1984, 20, 108.
CAJAL N., STRATI I., COPELOVICI Y. — Rev. Roum. Méd., Virol., 1983, 34, 131; Bacteriol., Virusol., Epidemiol. Parazitol., 1982, 27, 229.
CAJAL N. — Diagnosticul de laborator în inframicrobiologie, Edit. Academiei R.S.R., București, 1958.
CHAMPSAUR H. și colab. — J. Clin. Microbiol., 1983, 17, 357.
CHANTLER S. și colab. — J. Immunol. Meth., 1976, 13, 367.

NAKANE P. K., KAWAOI A. — J. Histochem. Cytochem., 1974, 22, 1 084.
NEGUŢ M., CODIŢĂ I., STRATI I. — Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol., 1984, 29, 1.
PAL S. R. şi colab. — Intervirology, 1983, 20, 19.
PAURI P. şi colab. — Boll. Ist. Sieroter. Milanese, 1980, 59, 205.
RAJAGOPALAN M. S., JACOB J. T. — J. Clin. Microbiol., 1982, 16, 549.
RAPICETTA M. şi colab. — J. Virol. Methods, 1983, 6, 303.
RICHMAN D. D. şi colab. — J. Infect. Dis., 1981, 143, 693.
RICHMAN D. D. şi colab. — J. Infect. Dis., 1984, 150, 941.
RYTEL M. (red.) — Rapid Diagnosis of Infectious Diseases, CRC Press Inc., 1979.
SCHMIDT W. A. K. şi colab. — Zent. bl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg., 1981, ser. *A*, 250, 25.
SCOTT A. A. şi colab. — J. Clin. Microbiol., 1988, 26, 1 895.
SELIM G. — Lucrare de diplomă, I.M.F. Bucureşti, 1987.
SIMON M. — Acta Microbiol. Hung., 1977, 24, 307.
SKAUG K. şi colab. — Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand, ser. *B*, 1983, 91, 175.
STOKES C. E. şi colab. — J. Clin. Microbiol., 1988, 26, 1 263.
STRATI I., NEGUŢ M., CODIŢĂ I. — Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol., 1983, 28, 1.
TALBOT P. J. şi colab. — J. Immunol. Meth., 1984, 73, 177.
TOKUHISA S. şi colab. — Jpn. J. Vet. Sci., 1983, 45, 687.
VAN REGENMORTEL M. H. V., NEURATH A. R. (red.) — Immunochemistry of Viruses (The Basis for Serodiagnosis and Vaccines), Elsevier, Amsterdam — New York — Oxford, 1985.
VOLLER A. şi colab. — Bull. World Health Organ., 1976, 53, 55.
WARD A. C. S., KAEBERLE M. I. — Amer. J. Vet. Res., 1984, 45, 165.
WOODS G. L., MILLS R. D. — J. Clin. Microbiol., 1988, 26, 570.
YAMANE N. şi colab. — J. Clin. Microbiol., 1983, 18, 837.
YOLKEN R. H. — J. Infect. Dis., 1982, 4, 35.
* * * — Manual for Rapid Laboratory Viral Diagnosis, WHO Offset Publication, nr. 47/1979.
* * * — Rapid Methods and Automatization in Microbiology, R. C. Tillon (red.), ASM, Washington, 1982.
* * * — Immunodiagnosis simplified, Bull. World Health Organ, 1984, 62, 217.
* * * — Diagnosticul rapid al infecţiilor respiratorii acute de origine virală, Program de cooperare între România şi Biroul Regional O.M.S., 1985.

Redactor de carte : Dr. **IRINA BELOIU**
Tehnoredactor : **MIHAI ȘTEFANACHE**

Bun de tipar : 13.XII.1989.
Formatul : 16/70×100.
Hîrtia : scris I A 70×100/56.
Coli tipar : 46

Intreprinderea poligrafică „Oltenia"
Bulevardul 1 Mai nr. 102, Craiova
România

ISBN 973-10-0072-0
ISBN 973-10-0073-9

Lei 16.-